K. H. Fiebeler

Berlijn 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548901_0010

UNTERSUCHUNGEN ZUR BRAUCHBARKEIT DER

KLEBEBANDMETHODE BEI BLUTSPURENUNTERSUCHUNGEN

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.med. Karl-Heinz Fiebeler
geb. am 1. 1. 1940 in Halle/S.

Dekan: Prof. Dr.sc.med. G. Lies

Gutachter: 1. ______________________

2. ______________________

3. ______________________

Berlin, Dez. 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Bedeutung der MCAR auf Klebeband	1
1.2.	Übersicht zur Entwicklung auf dem Gebiet der Blutgruppendifferenzierung von Blutspurenmaterial	2
1.2.1.	Das ABO-System	3
1.2.2.	Das Sekretorsystem (Se/se)	9
1.2.3.	Das MN-System	10
1.3.	Methodische Einzelheiten von Blutgruppen-Bestimmungen an Spurenmaterial	11
1.3.1.	Die Blutgruppenbestimmung nach LATTES	12
1.3.2.	Die Agglutinin-Absorption bei der Blutgruppenbestimmung	12
1.3.3.	Die Methode der Agglutinin-Absprengung	13
1.3.4.	Die Bestimmung der Blutgruppen aus Spuren durch tierische Immunseren	14
1.3.5.	Die Mischzell-Agglutinationsmethode	15
1.3.6.	Methode zur Bestimmung der Blutgruppe aus dem Speichel von Sekretoren	18
1.3.7.	Methoden zur MN-Bestimmung aus Blutspuren	19
1.4.	Die Klebebandmethode in der gerichtlichen Medizin	20
2.	Untersuchungsmaterial und Methode	22
2.1.	Untersuchungsmaterial zur ABO-Blutgruppenbestimmung mit Hilfe der modifizierten MCAR	22

Seite

2.2. Prüfung der Methode von ISHIYAMA zur Blutgruppenbestimmung auf Klebeband und eigene Vorversuche 23

2.2.1. Beurteilung der Präparate 27

2.2.2. Untersuchungen zum Antikörpertiter der Anti-Seren und der Inkubationszeit 29

2.2.3. Methode der H-Bestimmung 30

2.2.4. Untersuchungen zur Bestimmung der Gruppensubstanzen aus dem Speichel 31

2.2.5. Auswertung der Vorversuche 32

2.3. Hauptversuche zur Blutgruppenbestimmung auf Klebeband 37

2.3.1. Material 37

2.3.2. Verwendete Anti-Seren und Indikatorerythrozyten 37

2.3.3. Verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel 38

2.4. Die im Hauptversuch angewandte Methode zur Blutgruppenbestimmung mit Hilfe der modifizierten MCAR 39

3. Ergebnisse und Diskussion 41

3.1. Darstellung der eigenen Ergebnisse 41

3.2. Anwendungsbeispiel für die Praxis 55

3.3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Arbeit von ISHIYAMA 57

3.4. Diskussion der Ergebnisse 61

3.5. Zusammenfassung 65

3.6. Literaturübersicht 67

Abkürzungsverzeichnis

A[illegible] – Absorptionsagglutinationsreaktion

M[illegible] – N[illegible]chzellagglutinationsreaktion

T[illegible] – [illegible]

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung der MCAR auf Klebeband

Auf der Suche nach empfindlicheren Methoden bei der Bestimmung von Gruppensubstanzen des Menschen im Spurenmaterial wurden immer neue Modifikationen bereits bekannter Untersuchungstechniken entwickelt.

Von dem Japaner ISHIYAMA[30] ist in der letzten Zeit eine modifizierte Methode der MCAR (mixed cell agglutination reaction) auf Klebeband bekanntgeworden, die er durch Einsendung einer Durchschrift seiner Originalarbeit dem Direktor des Institutes für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universitat vorlegte. Er gibt in dieser Arbeit an, aus blut- und speichelgetränktem Leinengewebe und Watte, aus Zigarettenresten, Fingerabdrücken, aus Hemd-, Kittel- und Kleiderschmutz und aus Paraffinpräparaten von menschlichem Organmaterial durch diese Mischzellagglutination die ABO-Blutgruppenbestimmung vornehmen zu können. Wir überprüften die angegebene Methode und untersuchten mit Hilfe der genannten Arbeitsvorschrift unterschiedlich gealterte Blut- und Speichelspuren, die auf Filterpapier und Stoffasern aufgebracht waren. Darüber hinaus versuchten wir, an einigen Mikrospuren Bestimmungen im MN-System vorzunehmen.

Im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden bei der Blutgruppenbestimmung handelt es sich bei der hier modifizierten Methode der Mischzellagglutination um ein ohne groben technischen Aufwand durchführbares Verfahren, das sich durch

eine hohe Zuverlässigkeit auszeichnen soll, wobei eine wisse Einarbeitungszeit und eigene Erfahrungen bei der Blutgruppenbestimmung unerläßlich sind. Die von uns angewendete und hier zu beschreibende Methode hat den Vorteil, daß schon nach einer Stunde eine Bewertung der zu untersuchenden Spur möglich ist.

1.2. Übersicht zur Entwicklung auf dem Gebiet der Blutspurendifferenzierung von Blutspurenmaterial

Bis zu Beginn des 19.Jahrhunderts kannte die Medizin keine Untersuchungsmöglichkeit für eine Blutdifferenzierung.

Im Jahre 1827 berichtete ORFILA (zitiert nach MOST[45]), daß er mit Hilfe des Mikroskopes Blute von Fischen, Reptilien Vögeln und Säugern untersucht hatte. Dabei fand er, daß die roten Blutkörperchen der Fische, Reptilien und Vögel einen Zellkern besitzen. Außerdem entdeckte er Unterschiede in der Form der roten Blutkörperchen; die der Vögel haben eine annähernd elliptische Gestalt, während die der Säuger mehr sphärisch geformt sind.

Zwei Jahre später beschrieben BARRUEL und COUERBE', daß

Männerblut unterscheiden können.

[illegible] veröffentlichte [illegible] eine Arbeit, in der er mitteilt, daß es mit

wäre, das Blut verschiedener Säugetierarten von dem des Menschen an der Form der "Globulinkristalle" unterscheiden zu können.

Die genannten Arbeiten zeigten wohl das Interesse der Medizin an einer Blutdifferenzierung, das Problem einer serologischen [illegible] erts brachte keine neuen Erkenntnisse auf diesem Gebiet.

1. Das ABO-System

[illegible] gelang UHLENHUTH[68] die exakte immunologische Unterscheidung [illegible] Tierblutarten vom Blut des Menschen. Im [illegible] deren Antikörper vorhanden sind, die die roten [illegible] anderer Menschen agglutinieren, wenn bestimmte [illegible] übertreffen. Durch die Agglutinationsverschei- [illegible] LANDSTEINER die Blutgruppen A, B und C, in [illegible] fentlichungen wurde die Blutgruppe C als "O" [illegible] 902 berichteten DECASTELLO und ST[illegible] über [illegible] der Blutgruppe AB. Es [illegible] "[illegible]ntinine". Seither werden vier Blutgruppen [illegible]:

[illegible]ruppe O (mit Anti-A und Anti-B im Serum)
[illegible]ruppe A (mit Anti-B im Serum)
[illegible]ppe B (mit Anti-A im Serum)
[illegible]ppe AB (ohne Isoantikörper).

Wenn also bekannte A Erythrozyten von einem unbekannten Serum agglutiniert werden, so kann das unbekannte Serum von einem B-Blut gewonnen worden sein. Gibt man dagegen zu bekannten B-Erythrozyten ein unbekanntes Serum, das die B-Erythrozyten agglutiniert, kann es sich um ein A-Serum handeln. Die andere Alternative ist, daß das A bzw. B agglutinierende Serum von einem Menschen der O-Gruppe stammt. Kommt es weder durch Zugabe von A-Erythrozyten noch durch die Zugabe von B-Erythrozyten zu einer Agglutination, so kann man annehmen, daß das Serum von einem AB-Blut stammt. Durch entsprechende Überlegungen hinsichtlich der Gesetzmäßigkeiten des "Horror autotoxicus" von Paul EHRLICH[13] kann auf die Gruppe AB geschlossen werden.

Bei der Bestimmung der ABO-Gruppe von Blutspuren sind grundsätzlich zwei Wege beschritten worden:

- Untersuchungen der ABH-Gruppensubstanz durch Agglutina-

- Untersuchung der eingetrockneten Isoagglutinine mit dem "Deckglasverfahren" nach Leone LATTES[40].

gruppen mit A_1 und A_2 bezeichnet. Es handelt sich hierbei

Blutkörperchen der Blutgruppe A_1 haben mehr und aktiver Rezeptoren für Anti-A-Agglutinine als Blutkörperchen der Blutgruppe A_2. A_2-Erythrozyten reagieren hingegen mit Phytagglutininen der Spezifität Anti-H in der Regel stärker als mit A_1-Testzellen.

Unter den ersten Verfahren, die A-Untergruppen in Blutspuren zu entdecken, sind die folgenden Verfahren zu nennen:

Bekannt wurde u. a. die Methode von HOLZER[26] (1931), der das STRASSMANNsche Verfahren modifiziert hat. A_1 und A_2 lassen sich auf diese Weise allerdings nicht sicher unterscheiden; das Absorptionsverfahren von HOLZER ist mitunter dadurch belastet, daß O-Seren neben einem Antikörper für A und B noch einen dritten besitzen, nämlich den "Kreuzreagierenden"-Anti-(A+B), den WIENER[71] auch "Anti-C" nennt. Die Existenz dieses dritten Antikörpers kann "unspezifische Titersenkungen" bewirken, wenn z. B. A-Blut sowohl Anti-A absorbiert als auch Anti-(A+B), wodurch der Anti-B-Titer ebenfalls we-
[illegible]

Nach Vorschrift von HOLZER werden getrocknete Blutspuren in ein O-Serum gebracht (Anti-A und Anti-B). Die Absorptionszeit beträgt bis zu 24 Stunden. Anschließend wird gegen A_1 [illegible]- und B-Erythrozyten getestet. Die Titersenkungen gegen- [illegible] - bzw. A_2-Testerythrozyten innerhalb der geometri- [illegible] [illegible] [illegible] eine eindeutige Differenzierung zu.

WAUSCHKUHN und JUNKMANN (1956)[21] bringen die getrockneten Blutspuren der Blutgruppe A mit einem Anti-A_1 Serum (B-Serum) (Titer 128) und einem Anti-A_2-Serum (Titer 64) zusammen und inkubieren 24 Stunden bei 3 Grad C. Dann wird ebenfalls eine geometrische Verdünnungsreihe angelegt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Minuten kommt es zu einer fast vollständigen Titersenkung gegen A_2-Indikatorerythrozyten, wenn mit einer A_1-Trockenspur absorbiert wurde. Bei einer A_2-Trockenblutspur ist nur eine Absenkung von 2 bis 3 Stufen gegenüber A_2-Testerythrozyten zu beobachten. Analog sind die Verhältnisse gegenüber A_1-Testerythrozyten, die Differenz in der Absenkung zwischen A_1- und A_2-Trockenblutspuren ist jedoch hier nicht so stark.

R. HITZEMANN[24] empfiehlt hingegen 1970 zur A-Untergruppen-Differenzierung an Blutspuren die Verwendung auch von Lektinen. Er setzt einer unbekannten Spur ein absorbiertes Anti-A_1-Serum, ein Anti-A_1-Phytagglutinin und ein wirksames Anti-H(A_2)-Phytagglutinin zu. Zur Sicherung des Ergebnisses prüft er die negativ gebliebenen Ansätze mit einem Ferment. Tritt jetzt eine unspezifische Agglutination auf, wird das erste Resultat gesichert.

[illegible] Labilität [illegible], [illegible] Differenzierung zwischen A_1 und A_2 in Blutspuren schwierig ist, besonders wenn es sich um A_1B oder um A_2B handelt. Die Bestimmung [illegible] betreffend die Differenzierung zwischen A_1B und A_2B [illegible] die Crux der Gerichtsmediziner. Der Absättigungs-

Diese Antikörper sind, wie PROKOP[52] schreibt, hauptsächlich spontan gebildete Antikörper. Nur in seltenen Fällen entstehen sie immunisatorisch durch eine Transfusion oder heterospezifische Schwangerschaft.

Für natürlich gebildete M- und N-Antikörper, die meist in der Kälte besser arbeiten, soll charakteristisch sein, daß sie sich durch einen Doppeldosiseffekt auszeichnen. Über dieses Phänomen berichten 1957 CROWLEY[7] und Mitarbeiter. Danach reagieren z. B. Anti-M (human) mit M-Zellen stärker als mit MN-Zellen. Dieser Tatsache wird man eingedenk sein, wenn es gilt, mit solchen Reagenzien spurenkundliche Untersuchungen vorzunehmen.

1.3. Methodische Einzelheiten von Blutgruppenbestimmungen an Spurenmaterial

Grundsätzlich erweist es sich als günstig, am Blutspurenmaterial sowohl die Antigen-Eigenschaft durch Antiseren zu bestimmen als auch die Agglutinine nachzuweisen. Bei den Untersuchungen muß berücksichtigt werden, daß die Antigen-Eigenschaften länger als die Agglutinine haltbar sind und sich infolgedessen besser nachweisen lassen als die Agglutinine einer vorliegenden Spur.

So hat PORTIGLIATTI[51] (1956) gezeigt, daß Isoagglutinine nur in ganz seltenen Fällen länger als zwei Jahre in einer Spur zu finden sind. Innerhalb der Agglutinine gibt es auch wieder Unterschiede in ihrer Haltbarkeit.

Obwohl die Rezeptoren nicht direkt nachweisbar sind, ist [illegible] antikörperhaltige Seren gegeben, dabei treffen Rezeptoren in der Blutspur auf die "combining sites" der Antikörper der Testseren (meist Isoagglutinine), und es kommt zwischen den Rezeptoren in der Blutspur und einem Teil der Isoagglutinine zu einer Bindung. Als Folge dieser Bindung können die Agglutinine gegenüber Testblutkörperchen abgeschwächt sein, oder die Agglutination ist sogar aufgehoben. Kommt es zu keiner Verklumpung der roten Blutkörperchen, so müßte eine Verbindung zwischen der agglutinierenden Substanz und einem entsprechenden Rezeptor stattgefunden haben. Das ist nichts anderes als der Absorptionstest nach SCHIFFs Prinzip.

HIGUCHI[23], HOLZER[26] und YAMAKAMI[75] verbesserten die Methode dadurch, daß sie eine Verdünnungsreihe in die Methode einbezogen. Auf diese Weise können auch geringe Titer-Senkungen erfaßt und damit die Blutgruppe bestimmt werden.

[illegible] Die Methode der Agglutinin-Absprengung

Schon 1909 hatten LANDSTEINER und [illegible][37] auf die Möglichkeit hingewiesen, bereits gebundenes Agglutinin durch vorsichtiges Erwärmen wieder abzulösen. Prinzip dieser Methode

ist die Anwendung der BROWNschen Molekularbewegung, die bei höheren Temperaturen schließlich die Adhäsionskräfte der Antikörper am Antigen überwindet.

NICKOLLS und PEREIRA[46] (1962) griffen diesen Gedanken auf und entwickelten die nachstehend beschriebene Methode: Zwischen der Blutspur und homologen Antikörpern kommt es zu einer Bindung. Anschließend wird mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, dann das Präparat vorsichtig erwärmt, wobei es zur Absprengung des schon gebundenen Agglutinins kommt. Wenn [illegible]

[illegible] gibt, läßt sich eine Agglutination nachweisen.

[illegible] ist die Adsorptions-Elusions-Methode auch die Basis [illegible] die Blutgruppenbestimmung an menschlichen Haaren, welches [illegible] als YADA Verfahren in die Literatur eingegangen ist [illegible]

[illegible] timmung der Blutgruppen in Spuren durch [illegible]

[illegible] DEISBERGER[?] [illegible] ein Verfahren, [illegible] Kaninchen-Anti-Schafblut-Seren die Blutgrup- [illegible] ne Anwendung dieses Prin[illegible] nichts bekanntgeworden.

2.1. Die Mischzell-Agglutinat.

COOMBS und DODD[2] (1961) haben sich um die Entwicklung der Mischzell-Agglutinationsmethode (MCAR) verdient gemacht. Sie ist zum Nachweis der Blutgruppen im ABO-System in Gewebsschnitten, aber auch an Blutspuren geeignet. Man geht davon aus, daß die zur Untersuchung benutzten Antikörper bi- oder [illegible] dem Antigen der Blutspur eine Bindung ein. Die noch freien Valenzen können sich nun ihrerseits mit den zugesetzten [illegible] weise an Erythrozyten der Blutgruppe B, so findet man [illegible] B-Antigen. Gibt man nun zu der Blut- [illegible] die Blutspur "gewaschen", und es werden Erythrozyten der [illegible] und anschließend ebenfalls mit B-Test- [illegible] körper gebunden wurde. Ähnliche Überlegungen [illegible] die Bestimmung der Blutgruppe O bzw. Ab zu.

[illegible] 1971 über eine Modifikation der Mischzell-

Alte Blutspuren werden auf silikonisierte Objektträger [illegible]bracht, Anti-A- bzw. Anti-B-Seren zugegeben. Die Se[illegible] sitzen einen Titer von 1 : 1000. Um die Blutgruppe O nachweisen zu können, benutzt RADCW Evonymusextrakt, ebenfalls mit einem Titer von 1 : 1000 gegen O-Zellen, wobei etwa 1[illegible] Stunden bei 4 Grad C inkubiert wird. Der Inkubation folgt ein "Auswaschen" des nicht gebundenen Serums bzw. Reagenz durch 6- bis 8-maliges Auftropfen und nachfolgendes Absaugen von eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung. An[illegible] Erythrozytensuspension in 1 %-iger Rinderalbuminlösung zugegeben und die Präparate in einer feuchten Kammer einer erneuten Inkubationszeit von 30 bis 120 Minuten unterzogen und darauf die Präparate mikroskopisch ausgewertet.

In einer Zusammenfassung schreibt ISHIYAMA[30], daß die Me[illegible]de der modifizierten Mischzell-Agglutination "alle Be[illegible]ngungen (bezüglich der Empfindlichkeit, Spezifität, ein[illegible]

[illegible] Modifikation der MCAR beruht auf einem Prinzip, [illegible]IDSOHN[9] (1972) zur Bestimmung der Blutgruppenantigene an [illegible]tten angewandt hat, nämlich auf der [illegible]erung von nichtreagierenden Indikator[illegible] [illegible]bei wird wie folgt verfahren: Zu den Untersu[illegible] ISHIYAMA immune Anti-A- und Anti-B-Agglu[illegible] : 512 bis 1 : 1024) für A und B und zu[illegible] von Anti-H-Agglutininen, einmal Ulex

Anti-H (Titer 1 : 64 gegen intakte O-Zellen und 1 : 6400 gegen mit Pronase behandelte O-Zellen), zum anderen Anti-H-Seren (Titer 1 : 128 bis 1 : 256 gegen O und 1 : 10 000 gegen enzymatisierte O-Zellen). Als Indikatorzellen werden frische K30-Zellen benutzt. Ein doppelseitig haftender Klebebandstreifen wird mit der einen Seite auf den Objektträger geklebt, die andere Seite dient zur Aufnahme des zu untersuchenden Spurmaterial. Auf das durch Ankleben aufgenommene Untersuchungsmaterial tropft man die Antiseren und inkubiert bei Zimmertemperatur 15 Minuten. Nach der Inkubation werden die Präparate drei- bis fünfmal mit ca. 10 ml physiologischer Kochsalzlösung "gewaschen" und 20 Minuten in physiologische Kochsalzlösung gestellt. Nach Absaugen [illegible] die Zugabe von 2 - 3 Tropfen Indikatorzellsuspension. [illegible]zellen wurden vor Gebrauch dreimal in Kochsalzlö[illegible] und mit einer 10 %-igen glukosehaltigen [illegible]ung in einer Konzentration von 5 % aufgeschwemmt. [illegible]szeit von 10 bis 15 Minuten werden die [illegible] gekehrt in physiologische Kochsalzlösung so [illegible] nur das Spurenmaterial mit der Lösung in Be- [illegible] bt, daß nach 15 Minuten [illegible] ren Indikatorzellen abgefil- [illegible] inierten Erythrozyten der Spur [illegible] Mikroskop darstellen.

[illegible]

Speichel kann man im frischen Zustand untersuchen, aber auch an eingeschicktem Speichel lassen sich Gruppensubstanz- [illegible] gesandt wird, sollte er zuvor abgekocht werden, da im Speichel [illegible]

[illegible] on dem zu untersuchenden Speichel werden zur Bestimmung der [illegible] ubstanz mehrere Verdünnungsstufen hergestellt. Diese [illegible] ufen werden mit Seren gemischt, deren Titer be- [illegible] wichtig sei, da der Speichel in unverdünntem Zustand [illegible] vom Serum auch eine unspezifische Hemmung verursa- [illegible] 10, 1 : 100, 1 : 1000 an.

[illegible] mit der Blutgruppe O werden zur Bestimmung wie [illegible] Anti-H-Seren bzw. Anti-H-Lektine verwandt. In [illegible] iese Verfahren wegen des oft sehr ge- [illegible] empfindlich, so daß das Verfahren [illegible]

[illegible] Methoden zur MN-Bestimmung aus Blutspuren

Aus der uns zugänglichen Literatur über den Nachweis von MN-Eigenschaften kann man entnehmen, daß zur Bestimmung der Antigeneigenschaften dieselben Methoden verwendet werden können wie im ABO-System.

[illegible] gibt [illegible] ([illegible]) an, daß auf je [illegible] mg des Blutpulvers 0,[illegible] ml Anti-M- und Anti-N-Serum zu nehmen sind. Als Absorptionszeit nennt er 60 Minuten. Nach dem [illegible] ([illegible]) und [illegible] ([illegible]) [illegible].

[illegible] ung ist es notwendig, daß die Testzellen, die verwendet [illegible], frisch suspendiert sind, schon vier Stunden alte Sus[illegible]onen liefern nur schwache Agglutinationen. Auch bei die[illegible] [illegible]stimmungen spielt das Alter der Spur eine Rolle. So hat [illegible] gefunden, daß sich Spuren bis zu einem Alter von [illegible] [illegible]ten gut auswerten lassen, neun Monate alte Spuren [illegible] schwache Agglutinate ergaben.

[illegible] Anwendung der MCAR zur MN-Bestimmung werden keine Mo-[illegible] [illegible]en dieser Methode im Vergleich zur ABO-Blutgruppen-[illegible].

[illegible]

1971 erschienen erstmalig Veröffentlichungen über die Klebebandmethode, die Verfasser waren FREI SULZER und Aldo JOTTI[17], sie behandelten die Sicherung von Mikrospuren.

[illegible] großen materiellen Aufwand, einmal gesicherte Spuren können noch nach langer Zeit ausgewertet werden.

[illegible] [illegible]logische Untersuchungen durch die Klebemasse beeinträchtigt werden. Nässe und Kälte setzen die Wirksamkeit des Klebebandes herab.

[illegible] berichtet FREI[16] über die erfolgreiche Anwendung der [illegible]bandmethode bei einer gerichtsmedizinischen Fragestellung, z. B. inwieweit ein Erhängter sich selbst die Schlinge [illegible]t hat. Bei eindeutigen Suiciden können sich mit Hilfe der Klebebandmethode Faserspuren des Strangwerkzeuges an den [illegible]

[illegible] FREI-SULZER [illegible] [illegible]ng durch Klebeband von hohem Nutzen [illegible]se können noch kleinste Teilchen des zu [illegible]gewertet werden.

ISHIYAMA[30] wendet die Klebebandmethode für die Mischzell-Agglutination an. Dabei benutzt er zunächst einen doppelseitig gummierten Klebebandstreifen, den er auf den Objektträger aufklebt. Darauf klebt er dann einen einseitig gummierten Klebebandstreifen mit der daran haftenden Spur.

2. Untersuchungsmaterial und Methode

2.1. Untersuchungsmaterial zur ABO-Blutgruppenbestimmung mit Hilfe der modifizierten [illegible]

Die in den Blindversuchen bestimmten ABO-typisierten Blutspuren stammten aus dem Blutalterungsbuch des Instituts für [illegible]

Für die Bestimmung der Blutgruppensubstanz aus dem Speichel von Sekretoren hatten wir Teststreifen zur Verfügung, wie [illegible] zu bestimmenden Speichelspuren erhielten wir vom Blutgruppenlabor des Institutes, ein anderer Teil der Speichelspuren stammte aus dem Bezirksinstitut für Blutspendewesen [illegible]-Buch.

Mit Einverständnis des Institutes bekamen die Personen, die an bestimmten Tagen zur Blutspende bestellt waren, vor der Untersuchung und der anschließenden Blutspende [illegible] Teststreifen für die Speichelprobe und eine Filterzigarette. Die unangezündete Zigarette behielten die Probanden zwischen drei und fünf Minuten im Mund. Ehe die Blutspende begann wurde die Zigarette in ein Reagenzglas gegeben und von der Transfusionsschwester gesammelt. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, daß von dem anschließend typisierten Untersuchungsmaterial die Blutgruppe bekannt war.

Im Institut für Gerichtsmedizin wurde von jeder Speichelprobe ein Ansatz hergestellt und untersucht, ob es sich um [illegible] von einem Non-Sekretor handelt.

sich das Spurenmaterial gut aufnehmen. Da sich aber beim "Wassern" trotzdem Wasser zwischen das Prenaband setzte und sich die Seite mit der Blutspur durch die Feuchtigkeit wellte, erschien uns auch diese Möglichkeit für weitere Untersuchungen ungeeignet.

Schließlich probierten wir die Möglichkeit aus, die Klebeseite des Prenabandes mit Nagellack auf dem Objektträger zu befestigen. Wir verwendeten farblosen Nagellack mit dem Warenzeichen "SKÜS" aus dem VEB Berlin Kosmetik im VEB chem. Kombinat Miltitz, DDR. Der Nagellack muß etwa eine halbe Minute antrocknen, dann wird ein Streifen des Prenabandes auf den Nagellack aufgebracht und vorsichtig festgedrückt. Um keine anderen Spuren auf dem Prenaband zu hinterlassen, haben wir mit einer Schere und zwei Pinzetten gearbeitet. Nach etwa zehn Minuten war das Prenaband auf dem Objektträger festgeklebt, und es konnte das zu untersuchende Material aufgebracht werden. Später haben wir die Objektträger mit dem Prenaband schon am Tage zuvor vorbereitet, so daß immer eine genügende Anzahl sofort verwendbarer Objektträger bereitlag.

Wir benutzten als Spurenträger unterschiedliche Stoffproben und Filterpapier.

Bei den Modellversuchen wurden die Stoffproben in 1 cm lange Streifen geschnitten und in das zu untersuchende Blut gebracht. Der Streifen befand sich 3 bis 5 Minuten in der Blutprobe. Anschließend ließen wir den mit Blut getränkten

Streifen an der Luft trocknen. Nach dem Trocknen fixierten wir die Blutspur mit 5 %-igem Formalin 1 Minute. Alle Blutspuren untersuchten wir ohne Fixierung.

Auf einem sauberen Objektträger wurde der etwa 1 cm lange Streifen in kleinere Fasern zertrennt. Dazu verwendeten wir zwei Kanülen: mit der einen wurde das Stoffstückchen in der Mitte festgehalten, mit der anderen von der Mitte der Faser her nach beiden Seiten gestrichen, bis die Faser nach beiden Seiten zerspleißte. Diese Fäserchen wurden weiter zerzupft.

Die so vorbereiteten Fäserchen wurden von dem zum Zerzupfen der Faser benutzten Objektträger auf den mit Tesaband beklebten Objektträger übertragen. Das geschah einfach dadurch, daß die Klebeseite des Tesabandes vorsichtig auf die zerzupften Fäserchen gedrückt wurde. Drückte man zu sehr, konnte es passieren, daß das Tesaband von Fäserchen nicht mehr festgehalten wurde und sich löste.

[illegible] von jeder Spur neun Präparate angefertigt. Die Präparate wurden mit "1.1", "1.2", "1.3" in doppelter Ausführung und mit "L1", "L2" und "L3" (Leerpräparat) bezeichnet. Auf die Präparate 1.1 wurde Anti-A-Serum gegeben, auf die Präparate 1.2 Anti-B-Serum und auf die Präparate 1.3 Anti-H, auf die Leerpräparate war das Trägermaterial ohne Spur aufgebracht. Die Leerpräparate wurden mit Anti-A, Anti-B und Anti-H beschichtet, um spezifische Reaktionen der Seren bzw. des Anti-H mit dem Trägermaterial

auszuschließen. Als Inkubationszeit wählten wir wie ISHIYAMA zunächst 15 Minuten.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Präparate mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und zwar fünfmal mit je 10 ml Kochsalzlösung, um das überflüssige Agglutinin auszuwaschen. Nach dem Abspülen, welches mit einer Spritzflasche [illegible] physiologische Kochsalzlösung zur weiteren Entfernung des nicht gebundenen Agglutinins. . Wir verwendeten dazu Färbe- [illegible] DAVIDSOHN [illegible] vier Kammern zur Verfügung und konnten die Präparate getrennt wässern. Die ersten drei Kammern benutzten wir für [illegible] e Präparate mit dem Anti-H und den Anti-Seren, die letzte für die Leerpräparate.

[illegible] nächsten Arbeitsgang wurden die Präparate gemäß ihrer [illegible] und mit feinem Saugpapier vorsichtig betupft, um die über- [illegible] ssige physiologische Kochsalzlösung zu entfernen.

[illegible] chließend haben wir entsprechend den Antiseren die Indikator- [illegible] hrozyten zugegeben. Die Spur mit dem Anti-A-Serum wurde [illegible] -Testzellen behandelt, auf die Spur mit dem Anti-B- [illegible] m gaben wir B-Testzellen, und schließlich wurde die Spur [illegible] m Anti-H mit O-Testzellen zusammengebracht. Die nun [illegible] de Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Nach diesen 15 Minuten kamen die Präparate mit der Trennband nach unten in flache Plasteschalen. In diese Schalen war zuvor etwas physiologische Kochsalzlösung gegeben worden (die Objektträger liegen so auf den Plasteschalen, daß der Rand dieser Schalen als Auflage dient und nur die Seite, auf der sich die Spur befindet, in die physiologische Kochsalzlösung eintaucht).

Die nicht gebundenen Erythrozyten fallen entsprechend der Schwerkraft auf den Boden der Schale ab, zu dieser Sedimentation der nicht-agglutinierten Erythrozyten blieben die Präparate nochmals 15 Minuten in den Plasteschälchen liegen. Nun konnte die mikroskopische Auswertung vorgenommen werden.

4.4.1. Beurteilung der Präparate

Grundsätzlich haben wir nur die Präparate bewertet, die eine deutliche Reaktion an den Fasern zeigten. Agglutinate, die neben den Fasern zu finden waren, haben wir nicht berücksichtigt, wenn an den Spurenträgern selbst keine Agglutinationen nachweisbar waren.

Bei Präparaten, die zwar an den Fasern Agglutinate trugen, diese aber nur ganz vereinzelt unter dem Mikroskop zu sehen waren, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Bestimmung der Blutgruppe zu wiederholen.

Tab. 1

Bewertungsschema für die Präparate

Bewertung	Bezeichnung	Befundbeschreibung
stark positiv	+++	Präparate, bei denen die Mehrzahl der Fasern dick mit Agglutinaten besetzt sind
deutlich positiv	++	Präparate, bei denen die Fasern mit Agglutinaten und ohne Agglutinate etwa zu gleichen Anteilen vorkommen
positiv	+	Fasern der Präparate tragen zwar deutliche Agglutinate, aber die Fasern ohne Agglutinate überwiegen
fraglich positiv	+/-	Präparate, die zwar an den Fasern Agglutinate tragen, aber diese nur ganz vereinzelt unter dem Mikroskop sichtbar sind (Bestimmung wurde wiederholt)
negativ	-	Fasern mit keinerlei Agglutinaten

In der Regel genügte eine Einstellung unter dem Mikroskop, um festzustellen, ob es sich um ein positives bzw. negatives Präparat handelt, da bei den positiven Präparaten die Erythrozyten dicht um und auf dem Trägermaterial lagen, während bei den negativen das Untersuchungsmaterial deutlich zu sehen war, und die wenigen Erythrozyten verstreut waren und keine Zusammenlagerung zeigten.

2.2.2. Untersuchungen zum Antikörpertiter der Anti-Seren und der Inkubationszeit

ISHIYAMA[30] hat seine Versuche mit hochtitrigen Seren durchgeführt. Er verwendete Seren, die einen Antikörper-Titer zwischen 1 : 500 und 1 : 1000 besaßen.

Bei unseren Versuchen gingen wir von hochtitrigem Anti-A (um 1 : 4000) und hochtitrigem Anti-B (um 1 : 4000) aus. Die Verdünnungen erfolgten auf Tüpfelplatten. Zunächst kam in jede Vertiefung der Tüpfelplatten 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung. Anschließend wurde in eine Vertiefung jeder Tüpfelplatte 0,2 ml Serum gegeben. Kochsalz und Serum wurden gut vermischt und die Hälfte davon in die nächste Vertiefung gebracht. Auf diese Weise entstand eine Verdünnungsreihe. Zu einer der Tüpfelplatten wurden dann die entsprechenden Erythrozyten zugegeben, nach 20 Minuten der Titer abgelesen.

Nachdem der Titer unseres jeweiligen Testserums feststand, konnte das auf Gebrauchsverdünnung gebrachte Serum den vorbereiteten Blutspuren auf Prenaband zugefügt werden. Sowohl bei Anti-A (Titer 1 : 4000) als auch bei Anti-B (Titer 1 : 4000) ließen sich bis zur 6. Verdünnungsstufe Präparate herstellen, die nach unserem Bewertungsschema drei Kreuze erhielten. Die 7. und 8. Verdünnungsstufe konnte noch zwei Kreuze erhalten, die 9. immerhin noch ein Kreuz. Erst die 10. Verdünnung brachte keinen eindeutigen Befund (+/-). Präparate, die mit den Antiseren der 11. und 12. Verdünnungsstufe behandelt wurden, zeigten nur noch vereinzelt, überwiegend aber keine, Agglutinate mehr.

Die Blutspendezentrale Berlin-Buch überließ uns diese Proben der durch künstliche Immunisierung gewonnenen hochtitrigen Seren (um 1 : 4000).

Wir konnten feststellen, daß trotz des hohen Titers nicht alle Seren gleich gute Ergebnisse bei der mikroskopischen Auswertung brachten, obwohl ausreichend Spurenmaterial vorhanden war.

Um die günstigste Inkubationszeit herauszufinden, wurde bei 48 Präparaten die Einwirkungszeit der Antiseren variiert. Wir wählten eine Ausgangszeit von 15 Minuten und verringerten die Inkubationszeit bis auf 3 Minuten.

2.2.3. Methode der H-Bestimmung

Für unsere Versuche benutzten wir als Ausgangslösung konzentriertes Anti-H vom Evonymus europaea, von dem eine Gebrauchsverdünnung hergestellt wurde. Zu den Versuchen verdünnten wir das Anti-H bis zu einem Titer von 1 : 32 mit physiologischer Kochsalzlösung. Bei höherem oder niedrigerem Titer kam es zu einer Zunahme der Fehlbestimmungen.

Eine Versuchsreihe diente auch der Prüfung der Anwendbarkeit von Anti-A_{HP}. Da ISHIYAMA[30] bei seinen Untersuchungen von einem hochtitrigen Anti-A-Serum ausging, verwendeten wir bei den ersten Modellversuchen auch das hochtitrige und avide heterophile Anti-A_{HP}. Bei positiven Reaktionen erzielten wir sehr starke Agglutinationen. Wir arbeiteten mit zwei Arten dieser Substanz, einmal mit Pulver aus der Eiweißdrüse von Helix pomatia, welches gelöst wurde, und die Lösung filtriert, zum anderen mit einer industriell hergestellten Lösung.

Der Nachteil des Anti-A_{HP} für unsere Bestimmungen bestand darin, daß beide Präparate offenbar eine hohe Klebrigkeit besitzen und so auch die nicht agglutinierten Erythrozyten auf dem Prenaband haften und auf diese Weise beim oberflächlichen Betrachten des Präparates Pseudo-Agglutinationen hervorrufen können. Durch gründliches "Waschen"und langes "Wässern" kann man diese Fehlerm glichkeit bei der Bestimmung herabsetzen. Nur besteht dann die Gefahr, daß sich durch den intensiven Spülvorgang die Spur vom Prenaband löst. Wie S. SCHNITZLER, G. GESERICK, W. KRÜGER, S. D. GOGOCHIA, A. B. MIRVIS und M. A. ANNENKOW[62] über ungewöhnliche Blutgruppenreaktionen durch Protectine berichten, ist es aber auch möglich, daß einzelne O und B-Blutmuster mit Anti-A_{HP} positive Reaktionen ergeben, so daß angenommen werden kann, daß der wirksame Bestandteil des Eiweißdrüsenextraktes von Helix pomatia L. in Form verschiedener Polymeren vorliegt. Aus den genannten Gründen haben wir in den Hauptversuchen nicht weiter mit Anti-A_{HP} gearbeitet.

2.2.4. Untersuchungen zur Bestimmung der Gruppensubstanz aus dem Speichel

Nachdem wir uns in die Methode der Blutgruppenbestimmung an Blutspuren eingearbeitet hatten, gingen wir zur Bestimmung der Blutgruppe aus dem Speichel über. Zunächst versuchten wir, die Blutgruppe aus dem Speichel sowohl bei Sekretoren als auch bei Non-Sekretoren zu finden. Unsere Ergebnisse bei diesen Bestimmungen waren bei Beginn der Untersuchungen unbefriedigend. Prozentual ausgedrückt, hatten wir 38 % Fehl-

bestimmungen (n = 800). Bei der Auswertung der Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt fanden wir, daß in der Mehrzahl die Speichel falsch bestimmt wurden, die von Personen stammten, die als Nichtausscheider bekannt waren. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen bestimmten wir nur noch Speichel von Ausscheidern von Gruppensubstanz.

2.3.5. Auswertung der Vorversuche

In den genannten Vorversuchen führten wir 800 Blutgruppenbestimmungen durch. In der ersten Phase wurden diese Bestimmungen an Frischblut vorgenommen, später auch an alten Blutspuren.

Während die Bestimmung der Blutgruppe A relativ schnell gute Ergebnisse brachte, bereiteten uns bei der Bestimmung der Blutgruppe das Herausfinden des günstigsten Titers für Anti-H und die Differenzierung zwischen der Blutgruppe O und A erhebliche Schwierigkeiten. Am längsten hatten wir an einer sicheren Bestimmung der Blutgruppe B zu arbeiten. Ein deutliches Absinken der Fehlbestimmungen war zu verzeichnen, als wir ein hochtitriges Anti-B-Serum zur Verfügung hatten.

Die Indikator-Erythrozyten wurden ständig im Kühlschrank aufbewahrt. Indikator-Erythrozyten, die unter Zimmertemperatur gehalten wurden, brachten eindeutig schlechtere Ergebnisse. Die Stärke der Agglutination der Indikator-Erythrozyten hing auch vom Alter der Suspension ab. Erythrozytenaufschwemmungen ohne Glukosezusatz waren eindeutig weniger haltbar als diejenigen, die 10 %-ige Glukose zugesetzt bekamen.

Bei dem verwendeten Serum, das mit dem Titer um 1 : 4000 lag, konnte man schon nach 5 Minuten Inkubationszeit bei der späteren mikroskopischen Auswertung brauchbare Bewertungen erreichen. Verglichen mit Präparaten, bei denen die Inkubationszeit 15 Minuten betrug, erhielten die Präparate mit der kürzeren Inkubationszeit niedrigere Bewertungsstufen entsprechend des vorgegebenen Bewertungsschemas. Die Präparate, bei denen die Inkubationszeit 10 Minuten dauerte, unterschieden sich nicht mehr wesentlich hinsichtlich der mikroskopischen

Nachdem wir also zunächst die Inkubationszeiten verkürzt hatten, wurden in weiteren Versuchen die Zeiten verlängert. Dazu

ruppensubstanz enthielt, aber trotz eines hochtitrigen Antirums nur schwache Agglutinationsbilder beobachtet werden ten. Hier brachte in den meisten Fällen auch eine Verlängerung der Inkubation bis auf 24 Stunden keine bessere Reaktion der Präparate bei der mikroskopischen Auswertung. Arbeiteten wir dagegen mit Seren, die einen Titer um 1 :12c

Wurde niedrigtitrigen Seren 1 %-ige Kochsalzlösung zugesetzt,

[illegible][48]

schrank gelegt, so ließ sich die Inkubationszeit nicht verkürzen, aber die unter dem Mikroskop beobachteten Agglutinate waren besonders stark ausgeprägt. Dieses Phänomen entspricht den Vorstellungen, wonach die Temperaturamplitude und das Temperaturoptimum der Isoantikörper vom IgM Typ niedrig, vom Immunantikörper des IgG-Typs aber höher (37 Grad C) liegt. Besonders augenfällig beobachteten wir diese Erscheinung bei der Bestimmung der Gruppensubstanz M unter Anwendung eines Spontanantikörpers von einem Spender der Gruppe N.

[illegible] folgende Fehlerquellen eliminiert:

- beim Bekleben des Objektträgers mit Prenaband

Beim Befestigen des Prenabandes mit Nagellack muß darauf geachtet werden, daß der Lack richtig antrocknet. Es kann sonst passieren, daß sich entweder das Stück Prenaband beim Abnehmen der zu untersuchenden Spur löst oder daß es beim "Waschen" und dem anschließenden "Wässern" in physiologischer Kochsalzlösung zum Ablösen des Prenabandes kommt. Ist die Spur aufgetragen, wird sie vorsichtig mit der Kante eines Objektträgers festgedrückt.

- bei der Verwendung der Anti-Seren und des Anti-H

Mit mittelstarken und schwachen Seren ist die Fehlerquote höher als bei hochtitrigen Seren. Am besten eignen sich zur Bestimmung der Blutgruppe Seren, die unmittelbar vor der Versuchsdurchführung aufgetaut werden. Mit einem Anti-H (Titer 1 : 32) konnten wir die besten Ergebnisse bei der Bestimmung

der O-Blutgruppen erzielen.

- beim "Waschen" und "Wässern" der Präparate

Das "Waschen" mit physiologischer Kochsalzlösung muß äußerst vorsichtig vorgenommen werden, damit sich das Präparat nicht vom Prenaband löst und abgespült wird. Wir haben eine Spritz-Flasche benutzt und in einem feinen Strahl die physiologische Kochsalzlösung über das Prenaband gegeben.

Beim "Wässern" gilt es zu beachten, daß die physiologische Kochsalzlösung vorgekühlt ist (Kühlschranktemperatur). Die Dauer des "Wässerns" haben wir von der Titerhöhe des Serums abhängig gemacht, in der Regel betrug die Zeit 20 Minuten. Für jedes Präparat hatten wir für das Einstellen in physiologische Kochsalzlösung ein gesondertes Gefäß zur Verfügung. Wurden mehrere Präparate parallel untersucht, kamen die Präparate mit dem gleichen Anti-Serum zum "Wässern" in ein Gefäß.

- beim Herstellen der Indikator-Erythrozyten Suspension

Wir benutzten zu unseren Bestimmungen der Blutgruppen Indikator-Erythrozyten, wie sie zum Auskreuzen von Blutkonserven verwandt werden.

Bezogen auf das Herstellungsdatum der Blutkonserven ließen sich die Indikator-Erythrozyten bis zu zehn Tagen nach dem Herstellungsdatum verwenden. Da wir jede Woche frische Blutmuster zur Verwendung hatten, gab es von dieser Seite keine Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Blutgruppe an Mikrospuren.

Für unsere Zwecke haben wir die Blutmuster dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung "gewaschen", danach stellten wir uns eine 5 %-ige Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung mit 10 %-iger Glukose-Konzentration her. Die Aufschwemmung bewahrten wir im Kühlschrank bei etwa 5 Grad C auf. Unter diesen Lagerbedingungen konnte die Suspension zwei Tage zur Bestimmung verwendet werden. Ohne Glukose benutzten wir die Suspension nur am Tage der Herstellung.

- <u>beim Bewerten des Spurenmaterials</u>

In Zweifelsfällen bei ausreichend vorhandenem Spurenmaterial sollte, bevor man sich festlegt, eine Wiederholung der Bestimmung vorgenommen werden. Wir haben die Präparate, die von uns eine Bewertung "fraglich positiv" bekommen hatten, in den Blindversuchen stets wiederholt. Einzeln im Gesichtsfeld flottierende Agglutinate haben wir nicht bewertet, wenn an den Fasern oder anderem Trägermaterial keine oder nur sehr schwache Agglutinate nachweisbar waren.

Oft ließen sich die Ableseergebnisse dadurch verbessern, daß die Präparate vor der mikroskopischen Beurteilung länger als 15 Minuten in der physiologischen Kochsalzlösung lagen, damit die nichtgebundenen Erythrozyten besser "sedimentierten".

2.3. Hauptversuche zur Blutgruppenbestimmung auf Klebeband

2.3.1. Material

Zur Bestimmung der Blutgruppe aus Blutspuren wurden sowohl frische als auch alte Blutflecken verwendet. Die ältesten Blutmuster stammten aus dem Jahre 1968. Als Spurenträger dienten Leinenfäserchen und Filterpapier. Die Blutgruppe aus dem Speichel von Sekretoren wurde ebenfalls an frischen und alten Speichelspuren bestimmt, als Trägermaterial dienten wie bei den Blutspuren Leinenfäserchen und Filterpapier, außerdem Zigarettenfilter. Die Speichelspuren waren bis zu zehn Tage alt. Als letztes bestimmten wir mit Hilfe eines menschlichen Anti-M verschiedene Blute mit der Gruppensubstanz M, die Blutspuren waren auch hier auf Filterpapier aufgebracht. Das Alter dieser Spuren betrug acht Tage.

2.3.2. Verwendete Anti-Seren und Indikator-Erythrozyten

Als Anti-Seren lagen vor:

Anti-A-Serum (human) (Titer 1 : 1024) aus der Blutspendezentrale Berlin-Lichtenberg, Reg.-Nummer: B/81/110/74

Anti-B-Serum (human) (Titer 1 : 1024) aus der Blutspendezentrale Berlin-Buch, Reg.-Nummer: 19 274

Anti-H-Reagenz (Evonymus europaeus)(Titer 1 : 32) aus dem Institut für gerichtliche Medizin Berlin

Anti-M (human) (Titer 1 : 64) aus dem Institut für Blutspendewesen Karl-Marx-Stadt

Als Indikator-Erythrozyten lagen vor:

A-Indikatorzellen

B-Indikatorzellen

C-Indikatorzellen.

Die Indikator-Erythrozyten stammen aus der Blutspendezentrale Berlin-Lichtenberg. Wir haben die Indikator-Erythrozyten aus Stabilisatorbluten gewonnen, die bis zu 8 Tage alt waren. Die Blute wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurde eine 5 %-ige Indikator-Erythrozytenaufschwemmung in physiologischer NaCl-Lösung mit 10 %-iger Glukose hergestellt. Die Testerythrozyten wurden im Kühlschrank bei 5 Grad C aufbewahrt.

2.3.3. Verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel

Mit Prenaband beklebte Objektträger dienten zur Aufnahme des Spurenmaterials. Die Seren wurden in Zentrifugengläschen in einer Kühltruhe (Temperatur - 20 Grad C) aufbewahrt. Weiterhin wurden eine Spritzflasche zum Abspülen der Antiseren verwendet, dazu histologische Farbekammern mit physiologischer Kochsalzlösung zum "wassern" der Präparate, Filtrierpapier, um nach dem "Waschen" die Präparate vorsichtig abzutupfen, schließlich flache Plastescnälchen zur Sedimentation der nichtgebundenen Erythrozyten. Die Blute, aus denen wir die Indikator-Erythrozyten gewannen, wurden bei 6000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Zur Bewertung der Präparate benutzten wir ein Mikroskop mit einer 100-fachen Vergrößerung.

2.4. Die im Hauptversuch angewandte Methode zur Blutgruppenbestimmung mit Hilfe der modifizierten MCAR

Die zuvor beschriebenen Teilschritte bei der ABO-Blutgruppenbestimmung mit Hilfe der MCAR auf Klebeband lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Das Material mit den zu untersuchenden Spuren wird zerfasert, bzw. es werden feinste Blutschüppchen abgelöst.

- Auf einen mit Prenaband beklebten Objektträger wird das Spurenmaterial übertragen. Von jeder Spur werden im ersten Arbeitsgang drei Proben angelegt. Drei Leerpräparate mit nur dem Trägermaterial werden als Kontrollen mitgeführt, um spezifische Reaktionen zwischen Trägermaterial und Seren auszuschließen.

- Zu den drei Proben und den Leerpräparaten werden 1 bis 2 Tropfen Anti-Seren bzw. Anti-H zugegeben, die zugegebenen Seren und Anti-H wirken 10 Minuten auf die Präparate ein.

- Nach der Inkubationszeit werden die Präparate fünfmal mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend in Färbekammern mit physiologischer Kochsalzlösung 20 Minuten gestellt. Die Färbekammern verwenden wir in der Funktion einer DAVIDSOHNschen Kammer.

- Die Präparate werden anschließend auf Filterpapier gelegt

und vorsichtig mit Filterpapier abgetupft, um die überflüssige physiologische Kochsalzlösung zu entfernen.

- Auf die zu untersuchenden Spuren werden 1 bis 2 Tropfen A-, B- oder O-Indikator-Erythrozyten gegeben. Es folgen 10 Minuten Inkubation.

- Die Präparate werden mit dem Prenaband nach unten in flache Plasteschälchen gelegt. In den Plasteschälchen befindet sich physiologische Kochsalzlösung. Der Rand der Schälchen wird von den Objektträgern zur Auflage benutzt. 5 bis 10 Minuten bleiben die Objektträger auf den Plasteschälchen liegen.

- Die mikroskopische Beurteilung der Präparate ist jetzt möglich.

Bei der Bestimmung der Blutgruppe aus Speichelspuren auf Filterpapier und aus dem Zigarettenfilter wurde genauso wie bei Blutflecken vorgegangen. Alle zur Untersuchung verwendeten Speichelproben waren im Se/se-System nach vorheriger Kenntnis der ABO-Gruppe getestet, da sich die Untersuchungsmethode nur für Sekretorspeichel eignet. Die M-Bestimmungen aus Spurenmaterial wurden nach der gleichen Methode vorgenommen. In Abänderung zur oben beschriebenen Methode wurde die Inkubationszeit mit dem menschlichen Anti-M-Serum auf 12 Stunden verlängert und erfolgte im Kühlschrank.

Sowohl die Blutspuren als auch die Speichelspuren waren dem Verfasser verschlüsselt ausgehändigt worden. Der Schlüssel war beim Institutsdirektor hinterlegt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Darstellung der eigenen Ergebnisse

Nach dem Prinzip einer modifizierten Mischagglutination wurden Blutgruppenbestimmungen an Blutspuren vorgenommen und Speichelproben von Ausscheidern bestimmt. Insgesamt handelte es sich um 171 Bestimmungen der Blutgruppen, die in Blindversuchen ausgeführt wurden, davon 157 ABO-Bestimmungen (Abb.1) und 14 Präparate im MN-Blutgruppensystem.

Zur Asservierung der Spuren benutzten wir Prenaband. Bei den Arbeiten mit Klebeband konnten wir nicht feststellen, daß durch die Gummierung des Klebebandes die serologischen Abläufe beeinträchtigt wurden.

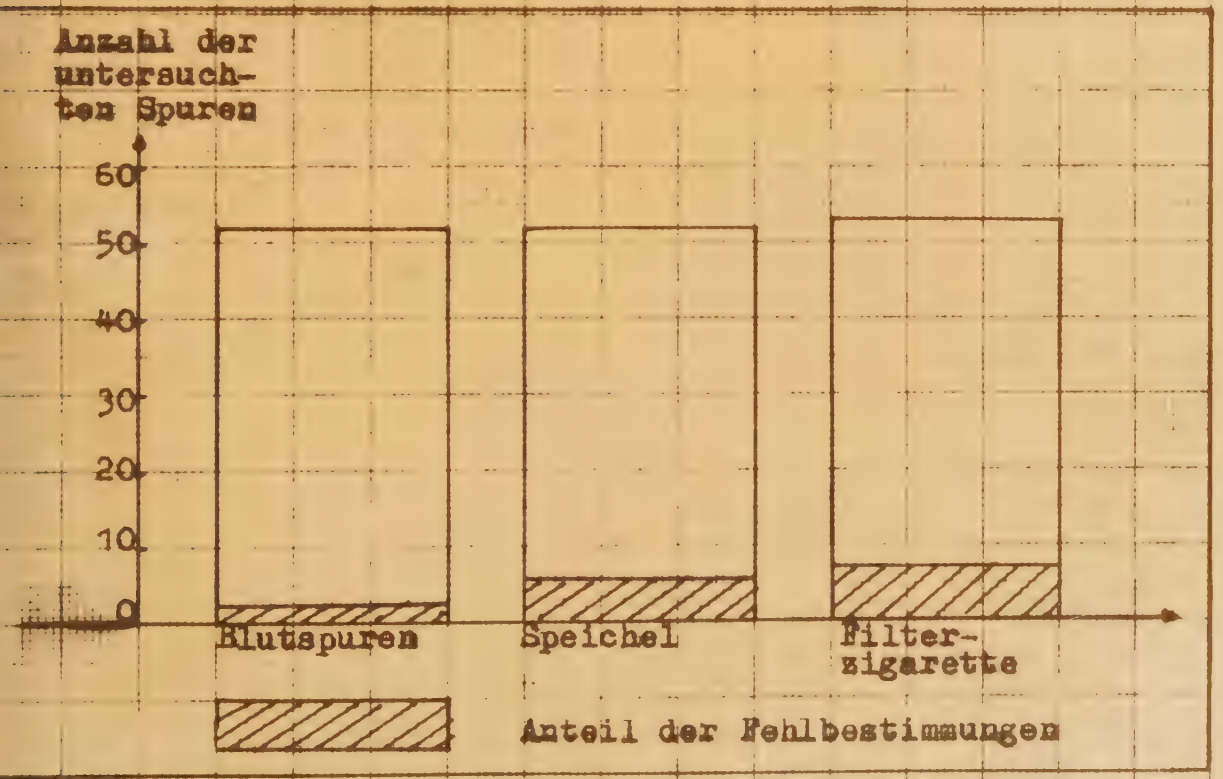


Abb. 1
Anteil der Fehlbestimmungen bei der Blutgruppenuntersuchung (ABO-Bestimmung)

In zwei Blindversuchen wurden 52 verschlüsselte Blutspuren auf Filterpapier untersucht. Es handelte sich um Blutspuren verschiedenen Alters. Die ältesten Spuren stammten aus dem Jahre 1968, die neuesten waren 1975 angelegt.

Von den 52 untersuchten Blutspuren konnten 50 Präparate richtig bestimmt werden; die beiden falsch bestimmten Spuren gehörten zur Blutgruppe A_2B. In beiden Fällen ordneten wir die Spuren der Blutgruppe B zu. Insgesamt lag bei den verbliebenen 50 bestimmten Blutspuren folgende Verteilung vor:

Blutgruppe A	16
Blutgruppe B	8
Blutgruppe AB	11
Blutgruppe 0	15
	50

Bei der Bestimmung der Blutgruppe aus dem Speichel von Sekretoren war die Spur auf Filterpapier aufgebracht. In mehreren Blindversuchen wurde bei 52 Sekretoren an Hand der Blutgruppensubstanz im Speichel die Blutgruppenbestimmung vorgenommen. 5 Speichel wurden falsch zugeordnet, bei diesen handelte es sich um Speichel mit Blutgruppensubstanzen der Blutgruppe A_2B. Wir bestimmten diese Speichel als Speichel mit B-Blutgruppensubstanz. Bei den richtig bestimmten Speichelspuren ergab sich folgende Verteilung:

Blutgruppe A	21
Blutgruppe B	15
Blutgruppe AB	3
Blutgruppe 0	8
	47

Es wurden 53 Speichelspuren an Zigarettenfiltern der Marken Cabinet, HB und Juwel untersucht. Teilweise stammten die Filter von gerauchten Zigaretten, teilweise hatten Probanden die Filterstücke ungerauchter Zigaretten etwa 5 Minuten im Mund.

Von den 53 untersuchten Filtern wurden 46 Blutgruppen richtig bestimmt. Auch hier trat die häufigste Fehlbestimmung bei der Blutgruppe A_2B auf. Sie wurde dreimal falsch bestimmt, und zwar wurden die Spuren zur Blutgruppe B gehörig angesehen. Einmal wurde A_1B als B-Blutgruppenspur eingeordnet, einmal 0 als A und A als 0 und schließlich eine Zigarette, die von einem Menschen mit der Blutgruppe B geraucht wurde, als eine 0-Spur bestimmt. Die richtig bestimmten Blutgruppen aus den Zigarettenfiltern zeigten folgende Verteilung:

Blutgruppe A	14
Blutgruppe B	12
Blutgruppe AB	5
Blutgruppe 0	15
	46

Zur M-Typisierung von Blutspurenmaterial mit einem menschlichen Anti-M wurden 14 Blutspuren, die auf Filterpapier aufgebracht waren, mit Hilfe der modifizierten MCAR im Blindversuch bestimmt. Die Spuren waren 3 Tage alt. Bis auf ein Präparat wurden alle Spuren richtig eingeordnet. Bei dem falschbestimmten Präparat handelte es sich um eine Blutspur mit N-Blutgruppensubstanz, die von uns zu der Gruppe mit M-Blutgruppensubstanz gezählt wurde. Die zu untersuchenden Blutspuren schlüsselten sich wie folgt auf:

Blutgruppensubstanz N	2
Blutgruppensubstanz M	7
Blutgruppensubstanz MN	5
	14

Sowohl bei den Blut- als auch bei Speichelspuren von Sekretoren überwogen die eindeutig positiven Befunde (nach unserem Bewertungsschema Präparate mit zwei und drei Kreuzen).

Die aufgespleißten Spurenträger waren dicht mit zusammengeballten Erythrozyten besetzt, und in der Suspension um die Faser waren ebenfalls deutliche Agglutinate unter dem Mikroskop zu sehen.

Bei negativen Untersuchungsbefunden waren die Fasern entweder gar nicht von Erythrozyten umlagert, oder man sah nur vereinzelte Blutkörperchen auf den Fasern.

Abbildung 2 zeigt einen "deutlich positiven" Befund. Man erkennt eindeutig die mit Erythrozyten besetzten Fäserchen. Auch zwischen den Fäserchen sind Agglutinationen von Erythrozyten zu finden.

Auf der 3. Abbildung ist ein Stückchen Zigarettenfilterpapier zu sehen. Wir haben das Präparat als "stark positiv" bewertet. Das Zigarettenfilterpapier ist stellenweise wegen der Testerythrozyten kaum noch zu sehen. Die Spur ist ebenfalls von agglutinierten Erythrozyten umgeben. An verschiedenen Stellen der Aufnahme sind Rosettenbildungen zu sehen. Sie sind typische Mischzell-Agglutinationsgebilde.

Abbildung 4 zeigt ein "negatives" Präparat. Es handelt sich um das gleiche Trägermaterial wie in Abbildung 2. Bei dieser Faser wurden zu einer A-Speichelspur Anti-B-Serum und B-Indikator-Erythrozyten gegeben. Es sind nur vereinzelte Erythrozyten zu sehen, die aber keine Zusammenballungen bilden.

Abbildung 5 zeigt ebenfalls ein "negatives" Präparat. Hier handelt es sich um eine Stoffaser. Die Faser trägt keine Spur und wurde mit Anti-[illegible] behandelt. An der Faser sind keine Agglutinate zu sehen. Auch in der Umgebung der Faser finden sich keine Agglutinate.

Abbildung 6 zeigt einen "stark positiven" Befund. Auch hier liegen die agglutinierten Erythrozyten zum Teil so dicht, daß man stellenweise kaum die Faser sehen kann. Man könnte die

Agglutination als schichtige Zusammenballung bezeichnen (ISHIYAMA), da die Indikatorzellen palisadenartig dicht nebeneinander geordnet liegen.

Bei Abbildung 7 handelt es sich um ein "negatives" Präparat. Es liegt eine spurenfreie Stoffaser vor, auf der Anti-H-Serum und O-Testzellen aufgetragen wurden. Auch hier sind in der Umgebung des Trägermaterials keine Agglutinate von Erythrozyten zu sehen.

Technische Daten der Aufnahmen:
Amplival (ZEISS Jena); Planachromat 16/0,32/160/0,17, Projektiv K_4 pankrat. Kondensor n.A. 0.5, Blende 2/3; Filter VG 4; 6 V/16 W Einbauleuchte; Aufsetzkamera MF 24 × 36 mm; ORWO F 199: 5 Min. bei 25 Grad C

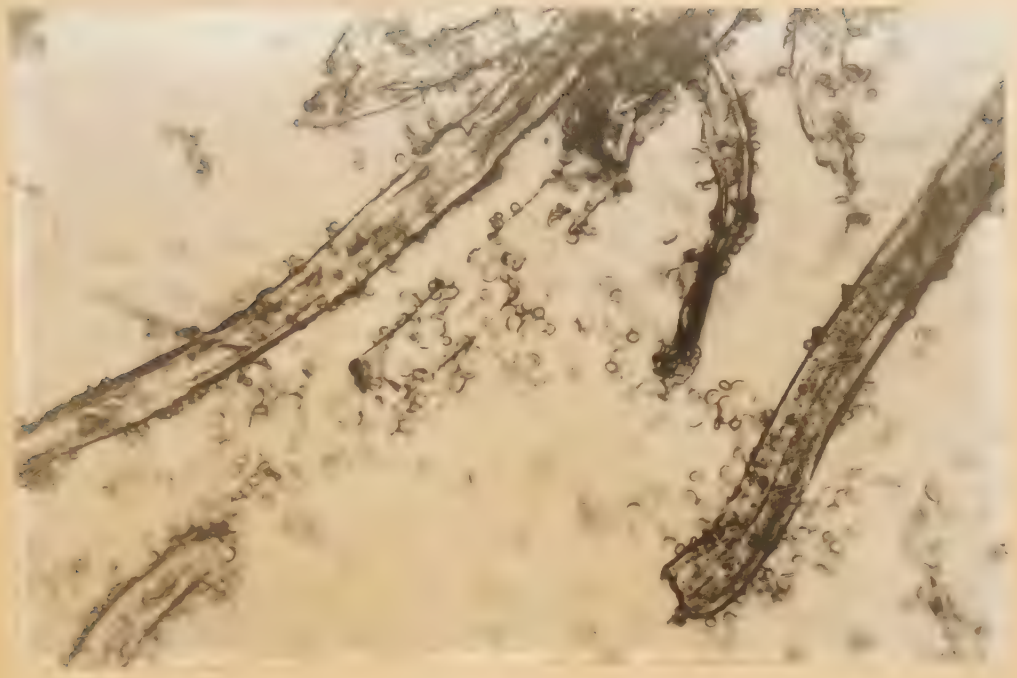


Abb. 2

Blutgruppenbestimmung an Speichel (Trägermaterial Zigaretten-filterfasern - Blutgruppe A). Positive MCAR

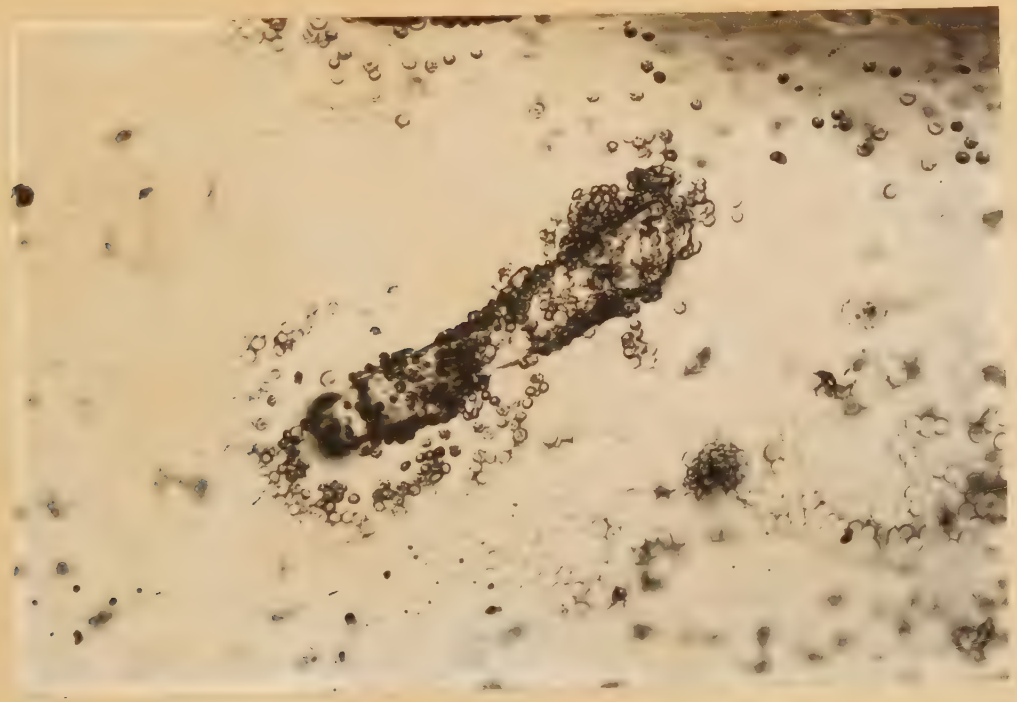


Abb. 3

Blutgruppenbestimmung an Speichel (Trägermaterial Zigaretten-filterpapier - Blutgruppe AB). Positive MCAR

Abb. 4

Blutgruppenbestimmung an Speichel (Trägermaterial Zigaretten-filterpapier - Blutgruppe A). Negative MCAR

Abb. 5

Leerpräparat (Die Stoffaser trägt keine Spur, wurde mit Anti-A-Serum und A-Indikatorzellen behandelt). Negative MCAR

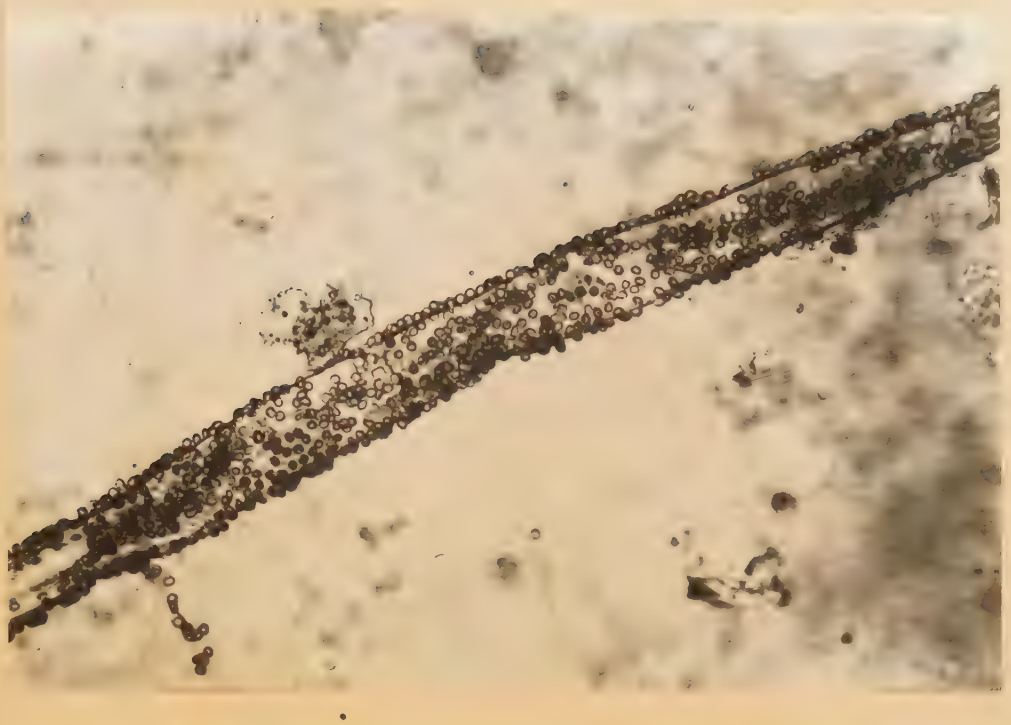


Abb. 6

Blutgruppenbestimmung an einer Blutspur (Trägermaterial Filterpapier - Blutgruppe B). Positive MCAR

Abb. 7

Leerpräparat (Die Filterpapierfasern tragen keine Spur, sie wurden mit Anti-H-Serum und O-Indikator-Erythrozyten behandelt). Negative MCAR

Wenn von einer Spur mehrere Präparate angefertigt wurden und diese gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren, sind wir bei der Bewertung dieser Spuren nicht immer zu gleichen Ergebnissen gekommen, die Präparate unterschieden sich hinsichtlich der Agglutinationsstärke. Besonders deutlich waren diese Unterschiede bei den Speicheluntersuchungen auf Filterpapier und am Zigarettenfilter.

Einmal in der Woche erhielten wir aus Berlin-Buch mehrere Milliliter verschiedener hochtitriger Seren, die im Titer zwischen 1 : 512 und 1 : 2048 lagen. Wir beschickten unter gleichen Versuchsbedingungen Proben der gleichen Blutspur mit Seren der entsprechenden Antikörper. Bei der Auswertung der Präparate gab es häufig Unterschiede in der Agglutinationsstärke.

Es kam aber auch vor, daß wir Anti-Seren mit Titern zwischen 1 : 128 und 1 : 256 zur Bestimmung der Blutgruppe einsetzten. Wir hatten auch bei der Verwendung dieser Seren Präparate darunter, die nach unserem Auswertungsschema als "stark positiv" bewertet werden konnten.

Insgesamt scheinen die Ergebnisse bei der Bestimmung der Gruppensubstanz günstiger auszufallen, wenn mit hochtitrigen Antiseren gearbeitet wird.

Die Auswertungsergebnisse veränderten sich auch, wenn die Inkubationszeit verändert wurde. Bis zu einer bestimmten

Zeit nahm mit der Verlängerung der Inkubationszeit die Stärke der Agglutination auf dem Klebeband zu und damit auch die Sicherheit bei der Beurteilung der MCAR (Abb. 8).

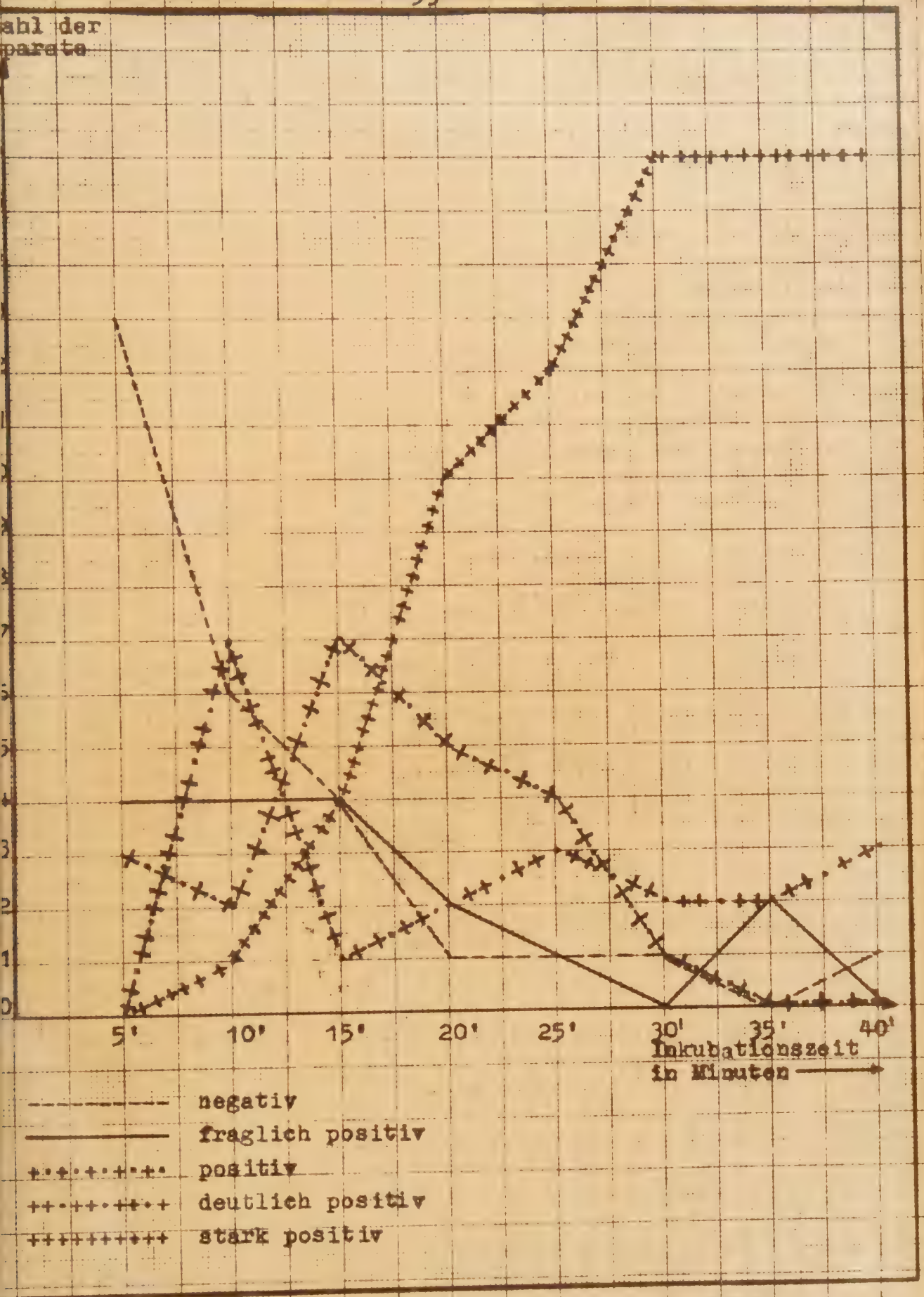
Wir stellten weiterhin fest, daß ein niedriger Titer eines Serums eine längere Inkubationszeit verlangt.

Die Tabelle 3 gibt nochmals eine Übersicht über das Verhältnis zwischen Inkubationszeit und Auswertbarkeit der Präparate, während die Tabelle 4 den Zusammenhang zwischen der Verdünnungsstufe des Serums und der Auswertbarkeit der Präparate darstellt.

Tab. 3

Verhältnis zwischen Inkubationszeit und Auswertbarkeit der Präparate

Inkubationszeit in Min.	Bewertung der Präparate (Anzahl)					Summe der Präparate
	-	+/-	+	++	+++	
5	13	4	3	-	-	20
10	6	4	2	7	1	20
15	4	4	7	1	4	20
20	1	2	5	2	10	20
25	1	1	4	3	11	20
30	1	-	1	2	16	20
35	-	2	-	2	16	20
40	1	-	-	3	16	20



bb. 8

erhältnis zwischen der Bewertbarkeit und Inkubationszeit
Spur und Antiserum; Titer 1 : 512) bei 20 Präparaten

Tab. 4

Verhältnis zwischen Verdünnungsstufen des Serums und der Auswertbarkeit der Präparate

Verdünnungsstufen der Anti-Seren (Ausgangstiter 1:512)	Bewertung der Präparate	
	A-Spur und Anti-A	B-Spur und Anti-B
1 : 2	+++	+++
1 : 4	+++	+++
1 : 8	+++	+++
1 : 16	+++	+++
1 : 32	+++	+++
1 : 64	+++	++
1 : 128	++	++
1 : 256	++	+
1 : 512	+	+
1 : 1024	+/-	-

3.2. Anwendungsbeispiel für die Praxis

Um die Brauchbarkeit der Untersuchungen an einem praktischen Beispiel zu demonstrieren, soll der Sektionsfall 487/75 aus dem Institut für gerichtliche Medizin Berlin angeführt werden.

Hier sind einem neunjährigen Jungen auf einem Heuboden vom Täter mehrfache Stichverletzungen mit einem Küchenmesser beigebracht worden. Die Blutspur an der Messerschneide war stark durch anhaftende Heupartikel verschmutzt und so geringgradig als dünner Film aufgetragen, daß eine Blutgruppenbestimmung nach LATTES bzw. eine Absorption nicht in Frage kam. Die einzige Möglichkeit, überhaupt eine Blutgruppenbestimmung an der Spur vorzunehmen, bot die von uns bearbeitete Mikrotechnik. Das Ergebnis unserer Untersuchung war zweifelsfrei und auswertbar. (Abb. 9)

Abb. 2

Messerklinge, von der die Blutspur abgenommen wurde

3.3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Arbeit von ISHIYAMA[30]

ISHIYAMA bestimmt in seiner Arbeit die Blutgruppen u. a. mittels modifizierter MCAR aus Blutspuren, Speichelflecken an verschiedenen Fasern und aus Zigarettenendstücken.

Während wir bei der Bestimmung der Blutgruppe aus dem Speichel von Nichtsekretoren durchweg schlechte Ergebnisse erzielten, schreibt ISHIYAMA: "Eigentümlichkeit von MCAR ueber den Ausscheidertypen (MCAR zeigt deutlich die Blutgruppeneigenschaft in Speichel von Nichtsekretoren an; diese Befunde sind von verschiedenen Forschern - DODD et al. 1963, PEREIRA 1963, MARESCH et al. 1964, PROKOP et al. 1965, SCHULZ 1974 - berichtet worden) zeigt einigermaßen wichtige Hinweise in Bezug auf der Biosynthese von ABO-Blutgruppensubstanzen vor. Ob es sich in diesem Thema um eine große Empfindlichkeit von MCAR oder um eine MCAR-eigne spezifische Eigenschaft handelt, ist noch nicht sicher erlaeutert. Die Tatsache, dass es kein quantitativer Unterschied in MCAR vorliegt - die Speichel von beiden Sekretortypen reagieren bis zur gleichen Verduennung (1 : 10.000) - stimmt vielmehr fuer die letzte Voraussetzung zu."

Auch bei genauer Nachvollziehung der Methode von ISHIYAMA ließ sich die Blutgruppe aus dem Speichel von Non-Sekretoren nicht ausreichend bestimmen. Es ist auch kaum anzunehmen, daß die von ISHIYAMA verwendeten immunen Anti-A-

und Anti-B-Agglutinine es ermöglichen, die Blutgruppe auch von Nichtausscheidern zu bestimmen. Bei den von ihm verwendeten Agglutininen handelt es sich um Erzeugnisse von Schering Co., Ltd., Kenilworth, U.S.A., Dade Co., Ltd. Miami, U.S.A., Nihonseiyaku Col, Ltd., Tokyo und Tokyo Standard Serums Col, Ltd., Tokyo, Japan.

Allerdings hatten wir bei unseren Vorversuchen auch Speichelspuren von Nichtausscheidern dabei, bei denen die Gruppensubstanz richtig bestimmt werden konnte. Wegen dieser positiven Ergebnisse haben wir immer wieder die Versuchsbedingungen modifiziert, indem wir die Inkubationszeiten, die Titer der Seren und des Anti-H oder Inkubationszeit und Titer zusammen veränderten. In einer Versuchsreihe hat die Inkubationszeit mit Anti H 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur betragen. Trotz der verschiedenen Versuchsbedingungen konnten wir die Ergebnisse beim Nachweis der Gruppensubstanz aus dem Speichel von Non-Sekretoren nicht entscheidend bei der Anwendung der modifizierten MCAR auf Klebeband verbessern. Die richtigen Bestimmungen waren entweder Zufallsergebnisse oder auf im untersuchten Speichel vorhandene Epithelzellen zurückzuführen, die dann die positiven Reaktionen hervorgerufen haben.

Eigentlich ist es auch unverständlich, daß es, obwohl man bei Ausschließuntersuchungen in Ausscheider und Nichtausscheider von Gruppensubstanz trennt, trotzdem möglich sein soll, aus dem Speichel von Nichtausscheidern Gruppensubstanz zu bestimmen.

Anderenfalls müßten dann schon genetische Spezialtypen ("Übergangsformen") angenommen werden. Sie sind oft behauptet oder bestritten worden. In ERSKINEs Lehrbuch der Blutgruppen[14] (1973) ist das Problem nicht mehr beachtet. Die Schwierigkeiten Se von se zu trennen, können folgende Ursachen haben

- Der Speichel besteht aus drei flüssigen Sekreten
  a) aus der Parotis
  b) aus der Glandula sublingualis
  c) aus der Glandula submandibularis.
  Die meiste Gruppensubstanz findet sich in der Glandula sublingualis (WOLF und TAYLOR[73] 1964).

- Die Zuordnung von O-Speichel zu Se und se ist unklar und hängt stark vom Reagenz ab. So können Extrakte von Ulex und von Cytisus semilifolius u. U. differente Ergebnisse bringen.

- Es können ggf. außer Se/se-Genen noch übergeordnete Gene über die Menge der ausgeschiedenen Gruppensubstanz wachen (GIUSTI, PANARI u. FIORI[18] 1972).

- Es gibt Hinweise, daß Personen des Sekretortyps vom Genotyp Se/Se mehr Gruppensubstanz ausscheiden als solche vom Se/se-Genotyp (MATSUNAGA[42] 1959).

- Die ausgeschiedene Gruppensubstanz ist heterogen (genetisch gesteuert; FIORI u.a. 1973).

Während ISHIYAMA bei seiner Methode einen doppelseitigen Klebebandstreifen auf dem Objektträger festklebt und darauf einen einseitigen Klebebandstreifen bringt, der die Spur trägt, klebten wir, da uns ein zweiseitig gummierter Streifen nicht zur Verfügung stand, Prenaband mit Nagellack auf die Objektträger.

Anfangs benutzten wir ebenfalls nur frische A-, B- und O-Zellen als Indikator-Erythrozyten. Wir stellten aber bei unseren Arbeiten fest, daß es sich ebensogut mit Stabilisatorbluten arbeiten läßt.

In der Arbeit von ISHIYAMA wurden die Versuche bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zunächst arbeiteten wir gleichfalls unter den bezeichneten Bedingungen, konnten aber feststellen, daß die Ergebnisse bei der Bestimmung der Blutgruppe besser waren, wenn die Präparate während der Inkubation im Kühlschrank den niedrigeren Temperaturen ausgesetzt waren. Unter diesen Bedingungen waren die Agglutinate an den Fasern besser ausgebildet.

ISHIYAMA schreibt, daß nur die Zellen als optimale Indikatorzellen anzusehen sind, die nicht länger als 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden, weil es sonst zu unspezifischen Reaktionen auf dem Klebeband kommen könnte. Wir konnten jedoch unsere Indikator-Erythrozyten 48 Stunden verwenden, ohne daß sich die Fehlbestimmungen häuften. Dabei stellten wir uns, wie im methodischen Teil der Arbeit beschrieben, die Indikatorzellsuspensionen aus Stabilisatorbluten her.

Wir stimmen mit ISHIYAMA überein, daß die Spurenmaterialien äußerst vorsichtig behandelt werden müssen, weil durch Verunreinigungen die Fehler bei der Bestimmung der Blutgruppe schnell zunehmen. Bei Einhaltung des Arbeitsschemas können diese Fehler aber vermieden werden.

3.4. Diskussion der Ergebnisse

Wie wir bereits im Abschnitt 3.1. erwähnten, hatten wir von 52 untersuchten unbekannten Blutspuren nur zwei Fehlbestimmungen, 5 Fehlbestimmungen von 52 Speicheluntersuchungen und 7 Fehlbestimmungen von 53 untersuchten Zigarettenfiltern. Wir glauben, damit den Beweis angetreten zu haben, daß die modifizierte MCAR auf Klebeband eine Methode darstellt, die sich zur ABO-Blutgruppenbestimmung eignet. Beim Beherrschen der Technik kann sie noch verwendet werden, wenn das Spurenmaterial es mengenmäßig nicht mehr erlaubt, das Absorptionsverfahren oder die herkömmliche MCAR einzusetzen. Bei der Auswertung der Präparate muß man beachten, daß bei Verwendung von Evonymusextrakt zum Nachweis einer O-Spur auch eine Mischzellagglutination mit B- und A-Antigene enthaltenden Spuren auftreten kann. Hier ist bei der Bewertung die Stärke der Agglutination entscheidend.

Es handelte sich bei einem Teil des von uns untersuchten Filterpapiers mit Speichelspuren um solches, das vorher für eine Vaterschafts-Ausschluß-Bestimmung benutzt wurde. Da für die Bestimmung Ausscheider/Nichtausscheider der mit

Speichel getränkte Streifen in feine Streifen zerschnitten wird, konnte es durchaus möglich sein, daß an dem verbliebenen Rest des Filterstreifens nur noch geringe Mengen Speichel vorhanden waren, die eine eindeutige Bestimmung der Blutgruppe nicht mehr zuließen.

Der Literatur ist zu entnehmen, daß bei der Verwendung der beschriebenen Methode viel weniger Spurenmaterial notwendig ist als bei anderen Bestimmungsarten wie beispielsweise der Absorptionsmethode, der Absorptions-Elutions-Reaktion und der Mischzellagglutination, von der unsere vorgestellte Methode eine Modifikation darstellt.

Betrachtet man die Bestimmungszeit, so wird beim Absättigungsversuch neben anderen Arbeitsgängen eine Absättigung von mindestens 24 Stunden in der Kälte gefordert, so daß bei der Anwendung des in unserer Arbeit beschriebenen Verfahrens eine deutliche Zeiteinsparung eintritt. Es braucht an dieser Stelle nicht besonders herausgestellt werden, daß es gerade bei spurenkundlichen Untersuchungen in gerichtlichen und kriminalistischen Instituten auf möglichst schnelle Untersuchungsergebnisse ankommt.

Da die Absättigungsmethode einen erheblichen Arbeitsaufwand erfordert, ist auch die Zahl der Fehlermöglichkeiten, die bei der Ausführung auftreten können, entsprechend groß.

Auch der Agglutinin-Absprengungsversuch dauert länger als die von uns angeführte Methode.

Ähnliches gilt für die Mischzell-Agglutination. Hier schreibt die Arbeitsanleitung beispielsweise vor, daß zu dem zu untersuchenden Material Antiserum zugegeben wird, dann bleibt die zu bestimmende Spur nach leichtem Zentrifugieren 12 Stunden in der Kälte stehen.

Vergleicht man die AER mit der MCAR, so wird in der Literatur die MCAR als eine viel empfindlichere Methode beschrieben. Als Nachteil für die MCAR wird angegeben, daß es bei dieser Reaktion schwieriger sei, spezifische von unspezifischen Reaktionen zu unterscheiden, während es bei der AER diese Schwierigkeiten bei der Auswertung nicht gibt, dafür braucht man eine ausreichende Menge des eluierten Agglutinins, damit die Agglutination der Testerythrozyten deutlich angezeigt werden kann.

Wir haben also festgestellt, daß die MCAR eine sehr empfindliche Methode zur Blutgruppenbestimmung darstellt, daß aber die Bestimmungszeit relativ lange dauert. Mit der modifizierten MCAR gelingt es nun, die hohe Empfindlichkeit dieser Methode auszunutzen und gleichzeitig die Untersuchungszeit deutlich herabzusetzen. Die Ergebnisse bei der Blutgruppenbestimmung aus alten Blutspuren zeigen, daß sich die Reaktionen auch erfolgreich auswerten lassen, wenn es sich um die Blutgruppen A, B, AB und 0 handelt. Um auch die Untergruppen im ABO-System mit dieser Methode differenzieren zu können, müßten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei für die Untergruppen spezifische Testseren eingesetzt werden könnten.

Die Unterschiede hinsichtlich der Aussagekraft bei der Bewertung der Präparate lassen sich dadurch erklären, daß die Spur von ihrer Asservierung bis zur mikroskopischen Betrachtung den verschiedensten mechanischen Einwirkungen ausgesetzt ist, zum anderen ist die zu untersuchende Gruppensubstanz auf dem Trägermaterial nicht gleichmäßig verteilt bzw. so gering vorhanden, daß sie sich mit der MCAR auf Klebeband nur äußerst schwach nachweisen läßt. Bei derart unklaren Ergebnissen ist eine Wiederholung angezeigt.

Von den 14 Präparaten mit MN-Blutgruppensubstanz konnten 13 identifiziert werden. Leider konnten wir die Methode nicht an einer größeren Anzahl von Spuren prüfen, da wir nur wenige Milliliter menschliches Anti-M-Serum zur Verfügung hatten. Deshalb verzichteten wir bei der MN-Bestimmung auf Versuche zur Inkubationszeit und Titerhöhe. Die Spuren mit dem Human-Anti-M-Serum wurden zur Inkubation 12 Stunden in den Kühlschrank gebracht. Auch das "Wässern" geschah bei Kühlschranktemperatur. 13 Präparate konnten als "deutlich positiv" bewertet werden.

Wir glauben, daß die von uns bearbeitete Methode der Blutgruppenbestimmung durchaus brauchbar ist, wenn eine Differenzierung der Blutgruppen A, B, AB und O vorgenommen werden soll. Die Methode zeichnet sich als relativ zuverlässig aus. Um aber zu sicheren Bestimmungen zu kommen, ist eine ausreichende praktische Erfahrung Voraussetzung.

3.5. Zusammenfassung

Die Arbeit gibt einen kurzen Überblick über die historische Entwicklung der Blutgruppendifferenzierung. Dabei zeigt sie verschiedene Methoden der spurenkundlichen Blutgruppenbestimmung auf und vergleicht diese mit der modifizierten Mischzell-Agglutination auf Klebeband nach ISHIYAMA.

Zu dieser Methode werden eigene Versuche mit Blutspuren und Speichelspuren von Sekretoren durchgeführt. Als Trägermaterial wurden Stoffasern, Filterpapier und Zigarettenkippen-Bestandteile verwendet. Insgesamt sind in Blindversuchen 157 Blutgruppenbestimmungen im ABO-System vorgenommen worden. Von 52 unbekannten Blutspuren bestimmten wir 2 Präparate und von 52 Speicheluntersuchungen von Sekretoren 5 Präparate falsch. 7 Fehlbestimmungen lagen bei 53 untersuchten Zigarettenfiltern vor.

Bei den Untersuchungen hat es sich als günstig erwiesen, mit hochtitrigen Anti-Seren (Titer 1 : 1024) zu arbeiten. Die günstigste Inkubationszeit liegt zwischen 20 und 40 Minuten (Abb. 8).

Im Vergleich zu anderen Methoden wird nur eine geringe Spurenmenge zur Auswertung benötigt, die zur Blutgruppenbestimmung verwendete Zeit beträgt etwa 1 Stunde.

Die Methode der modifizierten MCAR auf Klebeband kann auch zur Bestimmung der Blutgruppe im MN-System verwendet werden. Zum Nachweis der M Blutgruppensubstanz wurde mit einem menschlichen Anti-M-Serum gearbeitet, es wurden von uns 14 Proben untersucht.

Die von uns verwendete Versuchsvorschrift ist angegeben. Die angewendete Methode wird diskutiert und Fehlermöglichkeiten bei ihrer Anwendung werden aufgezeigt.

12. DUNGERN, E. von und HIRSCHFELD, L.: Über gruppenspezifische Strukturen des Blutes. III. Mitt. Zschr. Immunit. forsch. 3, 526 (1911)

13. EHRLICH, P.: Die Schutzstoffe des Blutes. Dtsch. Med. Wschr. 27, 913 (1901)

14. ERSKINE, A. G.: The principles and practice of blood grouping. Mosbg. Comp. Saint Louis (1973)

15. FREI-SULZER, M.: Die Sicherung von Mikrospuren mit Klebeband. Kriminalistik 5, S. 150 (1951)

16. FREI, M.: Beitrag zur Spurenkunde des Suicids durch Erhangen und Erdrosseln. Kriminalistik, 9, 345 (1955)

17. FREI-SULZER, M. und Aldo JOTTI: Vor- und Nachteile der Spurensicherung mit Klebband. Kriminalistik 20, 8 (1966)

18. GIUSTI, G. V.; PANARI, G. und FIORI, M. T.: Population and family studies on the amount of salivary ABH blood group substances. Vox Sanguinis, 22, 54 (1972)

19. GÖRING, H. D.; GROSS, A.; SIMON, A. und NAUSE, J.: Vergleichende experimentelle Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit verschiedener Methoden zur Blutgruppenbestimmung aus geringem Spurenmaterial. Zschr. ärztl. Fortb. 63, 7 (1969)

20. HAAS, W.: Kritisch-experimentelle Untersuchungen zum Nachweis von Speichel und Nasensekret und von Epidermis-, Schleimhaut- und Organzellen an Spurenträgern. Inaugurale-Diss. zur Erlangung des Doktorgrades. Universitat zu Marburg. Marburg 1968

21. HAUSBRANDT, F. und JURKUWEIT, A.: Untersuchung zur Untergruppenbestimmung (A_1 und A_2 an Trockenblut). Dtsch. Zschr. gerichtl. Med. 45 4 (1956)

22. HAYWARD, J.: The sub-typing of group A bloodstains. J. forens. Sci. Soc. 9 147 (1969)

23. HIGUCHI, S.: Über den Nachweis der vier menschlichen Blutgruppen in Blutflecken. Zschr. Immun.-Forschung 60, 246 - 269 (1929)

24. HILGERMANN, R : Neue Untersuchungen zur A-Untergruppen Differenzierung an Blutspuren.
Zschr. Rechtsmed. 68, 79 - 85 (1971)

25. HIRSZFELD, L.: Über die Anwendung der Blutgruppenforschung bei den Untersuchungen der Blutflecke.
Dtsch. Zschr. ges. gerichtl. Med. 27, 189 - 193 (1937)

26. HOLZER, F. J.: Ein einfaches Verfahren zur Gruppenbestimmung an vertrocknetem Blut durch Agglutininbindung.
Dtsch. Zschr. ges. gerichtl. Med. 16, 6 (1931)

27. HOLZER, F. J.: Die Untergruppen in der Blutgruppenforschung.
Klin. Wschr. 16, 14 (1937)

28. HOLZER, F. J.: Neue Erkenntnisse auf dem Gebiete der Blutgruppenforschung.
Wien. klin. Wschr. 61, 129 - 133 (1949)

29. ISHIYAMA, I.; TAKATSU, A.; UHLENBRUCK, G.; REIFENBERG, U; SCHNITZLER, S. und PROKOP, O.: Serological behavior of an "incomplete and super-agglutinating" Anti-A from the snail Helix pomatia.
Z. Naturforsch. 26 b, 171 (1971)

30. ISHIYAMA, I. und OKADA, T.: Auswertung der modifizierten Mischzellagglutination (mixed cell agglutination reaction, MCAR nach DAVIDSOHN) in der forensischen Serologie; MCAR auf dem Klebebandstreifen.

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Tokio. Unveröffentlichtes Manuskript Jan. 1975

31. KALCZEW, J.: Application of agglutinin inhibition method for determination of secretion and group membership of saliva in cigarettes.
III. Congreß of Polish Medicine. Wroclaw 1965

32. KÖLLIKER, A.: Mikroskopische Anatomie oder Gewebslehre des Menschen II.
Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann (1884)

33. KRÜPE, M.: Die praktische Brauchbarkeit der spezifischen pflanzlichen Hämagglutinine: Anti-"O" (H), Anti-A und Anti-B in der Blutgruppendiagnostik.
Zschr. Hyg. 136, 2, 200 (1953)

34. KRZYMANSKA, M.: Ein Beitrag zum Nachweis der Blutgruppenantigene A und B in Blutspuren.
Kriminalistik und forensische Wiss. 4, 151 - 152 (1971)

35. LANDSTEINER, K.: Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes.
Wien. klin. Wschr. 14, 1132 - 1134 (1901)

36. LANDSTEINER, K. und LEVINE, P.: Further observations on individual differences of human blood.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N. Y.), 24, 941 (1927)

37. LANDSTEINER, K. und REICH, M.: Über die Verbindungen der Immunkörper.
Centr. Bakt. Orig. 39, 83 - 93 (1905)

38. LANDSTEINER, K. und WITT, D. H.: Observations on the human blood groups. Irregular reactions. Iso-agglutinins in sera of group IV. The factor A_1.
J. Immunol. 11, 3, 221 (1926)

39. LAUER, A.: Zur Technik der Blutfleckdiagnose nach M und N.
Zschr. gerichtl. Med. 22, 86 (1933)

40. LATTES, L.: Praktische Erfahrungen über Blutgruppenbestimmungen in Flecken.
Dtsch. Zschr. ges. gerichtl. Med. 22, 86 (1933)

41. MÁJSKÝ, A.; PROKOP, O.; UHLENBRUCK, G. und MAČHAČKOVÁ, M.: Differenzierung der A_1B/A_2B Untergruppen mit Anti-A_{HP}-Agglutininen.
Ärztl. Lab. 16, 267 (1970)

42. MATSUNAGA, E.: Incomplete dominance of the gene for secretion of the blood group antigens in human saliva.
Jap. J. hum. Genet. 4, 173 (1959)

43. MERKELEY, D.: Isoagglutinins in dried blood stains.
Amer. J. clin. Pathol. 23, 190 (1953)

44. MORGAN, B. R. J.; RICHARDS, S. L.: Sub-typing of group A bloodstains.
Med. Sci. Law 7, 82 (1967)

45. MOST, F.: Ausführliche Enzyklopädie der gesamten Staatsarzeneykunde.
Leipzig, F. A. Brockhaus (1838)

46. NICKOLLS, L. and PEREIRA, M.: A study of modern methods of grouping dried blood stains.
Med. Sci. Law 2, 172 (1962)

47. ORFILA, M. J. B.:
zit. nach MOST, F.: Ausführliche Enzyklopädie der gesamten Staatsarzeneykunde.
Leipzig, F. A. Brockhaus (1833)

48. PATTERSON:
zit. nach PROKOP: Lehrbuch der menschl. Blut- und Serumgruppen.
VEB G. Thieme Leipzig 1975

49. PEREIRA, M.: The identification of MN-groups in dried blood stains.
Med. Sci. Law 3, 4 (1963)

50. POON and DODD, B.: The subdivision of blood stains into A_1 and A_2.
Med. Sci. Law 4, 258 (1964)

51. PORTIGLIATTI, M.: Sulla conservatilitá delle agglutinine in sieri essiccati etc.
Min. medicoleg. 76, 13 (1956)

52. PROKOP, O.: Forensische Medizin.
Volk und Gesundheit Berlin 1966

53. PROKOP, O. und UHLENBRUCK, G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. 2. Auflage.
VEB Georg Thieme Verlag Leipzig (1966)

54. PROKOP, O.; GELLER, W. und BROKOP, H.: Über die Herstellung hochtitriger A-Seren zur blutgruppenserologischen Diagnostik.
Klin. Wschr. 17/18, 422 (1952)

55. PUTKONEN, T.: Über die gruppenspezifischen Eigenschaften verschiedener Körperflüssigkeiten.
Acta Soc. med. Fenn. Duodecim., 14, 2, 107 (1930)

56. RACE, R. R. und SANGER, R.: Die Blutgruppen des Menschen. III. Auflage (Deutsche Übersetzung von O. PROKOP).
Thieme, Stuttgart (1958)

57. RADOW, G.: Erfahrungen mit der Mischzellagglutination.
Kriminalistik und forensische Wiss. 4, 143 - 144 (1971)

58. SCHIFF, F.: Das chemische Verhalten der serologischen Gruppenstoffe A und B, ihr Vorkommen und ihr Nachweis in Körperflüssigkeiten.
Klin. Wschr. 8, 1523 - 1525 (1929)

59. SCHIFF, F. und ADELSBERGER, L.: Über blutgruppenspezifische Antikörper und Antigene.
Zschr. Immunit. forsch. 40, 4/5, 335 (1926)

60. SCHIFF, F. und SASAKI, H.: Der Ausscheidungstypus, ein auf serologischem wege nachweisbares mendelndes Merkmal.
Klin. Wschr., 11, 34, 1426 (1932)

61. SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich medizinischen Blutspurenuntersuchungen.
Schmidt-Romhild-Verlag Lübeck 1966

62. SCHNITZLER, S; GESERICK, G.; KRÜGER, W.; GOGOCHIA, S.D.; MIRVIS, A. B. und ANNENKOW, A. B.: Ungewöhnliche Blutgruppenreaktionen durch Protectine.
Ärztl. Lab. 17, 236 (1971)

63. SIRACUSA, V.: La sostanza isoagglutinabile del sangue e la dua dimostrazione per la diagnose individuale delle macchie.
Arch. Antropol. crim. 47, 307 (1927)

64. SIRAY:
zit. nach YOSIDA, K. I.: Über die gruppenspezifischen Unterschiede der Transsudate, Exsudate, Sekrete, Exkrete, Organextrakte und Organzellen des Menschen und ihre rechtsmedizinische Anwendung.
Zschr. ges. exp. Med. 63, 331 - 339 (1928)

65. SYLVIA, F. and KIRK, P.: Specificity in blood grouping of plant lectins and the application of N-lectins to dry bloodstains.
J. For. Med. 8, 172 (1961)

66. THERKELSEN, F.: Typenbestimmung bei gerichtlich medizinischen Fleckenuntersuchungen.
Zschr. Rassenphysiol. 8, 98 (1936); 9, 1 (1937)

67. TOBISKA, J.: Die Phythämagglutinine.
Akademie Verlag Berlin 1964

68. UHLENHUTH, P.: Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten, im besonderen zum differentialdiagnostischen Nachweis des Menschenblutes.
Dtsch. med. Wschr. 27, 32 - 33 (1901)

69. UHLENBRUCK, G.: Blutgruppenspezifische Substanzen aus menschlichen Erythrozyten.
Hippokrates, 32, 537 (1961)

70. WALLENFANG, H.: Untersuchungen zur MN-Faktorenbestimmung an Blutausstrichen und Blutflecken mittels Absättigungs-Absprengungsverfahren.
Dissertation Bonn 1965

71. WIENER, A. S.: Isoagglutinins in dried blood stains. A sensitive technique for their demonstration. Journal of Forensic Medicine, 10, 4 (1963)

72. WOLFF, E. und JONSSON, B.: Studien über die Untergruppen A_1 und A_2 mit besonderer Berücksichtigung der Paternitätsuntersuchungen. Dtsch. Zschr. ger. Med. 22, 65 (1933)

73. WOLF, R. O. und TAYLOR, U.: The concentration of blood group substance in the parotis, sublingual and submaxillary salivas. J. dent. Res. 43, 272 (1964)

74. YADA, S.; OKANE, M. und SANO, Y.: Blood grouping of human hairs derived from various parts of the body. Acta crim. Med. leg. Jap. 33, 52 (1966)

75. YAMAKAMI, K.: The individuality of semen, with reference to its property of inhibiting specifically isohaemagglutination. J. Immunol. 12, 185 (1926)

76. YOSHIDA, K.: On the examination of blood stains. Nagasaki, Igakkai Zassui 34, 10 (1959)

77. YOSIDA, K. I.: Über die gruppenspezifischen Unterschiede der Transsudate, Exsudate, Sekrete, Exkrete, Organextrakte und Organzellen des Menschen und ihre rechtsmedizinische Anwendung. Zschr. ges. exp. Med. 53, 331 - 339 (1926)

Für die Überlassung des Themas der Arbeit durch den
Direktor des Instituts für gerichtliche Medizin der
Humboldt-Universität (Charité) Berlin,
Herrn Prof. med. habil. Otto Prokop,
und für seine hilfreiche Förderung der Arbeit
möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Gleichzeitig gilt mein Dank den Mitarbeitern des
Instituts, die die Arbeit unterstützten.

THESEN (Promotion A)

zum Thema:

"Untersuchungen zur Brauchbarkeit der Klebebandmethode bei Blutspurenuntersuchungen"

vorgelegt von Dipl.med. Karl-Heinz Fiebeler

1. Der historische Überblick - soweit er im Rahmen der Arbeit notwendig ist - über einige spurenkundliche Methoden zur Bestimmung der Gruppensubstanz des Menschen zeigt, daß die Empfindlichkeit dieser Methoden mit der Entwicklung der Serologie zunimmt und immer weniger Spurenmaterial zur Untersuchung benötigt wird.

2. Die modifizierte MCAR auf Klebeband ist eine Methode, die sich zur Bestimmung von Gruppensubstanz aus dem Blut und aus dem Speichel eignet.

3. Sie kann auf Grund des geringen Spurenmaterials auch dann noch eingesetzt werden, wenn andere herkömmliche Methoden versagen.

4. Es ist wahrscheinlich, daß MN-Eigenschaften ebenfalls durch die MCAR auf Klebeband bestimmt werden können.

5. Grundlage für die eigenen Untersuchungen war die Arbeit von ISHIYAMA über die MCAR auf Klebeband.

6. Die Methode zeichnet sich vor anderen serologischen Methoden aus, da sie weniger zeitaufwendig ist und nur wenig Spurenmaterial benötigt.

7. Es wurden 171 Bestimmungen der Blutgruppe vorgenommen, davon 157 im ABO-System und 14 Bestimmungen im MN-Blutgruppensystem.

8. Von 52 unbekannten Blutspuren auf Filterpapier wurden 2 Präparate falsch bestimmt.

9. Von 52 Speicheluntersuchungen von Sekretoren wurden 5 Präparate falsch bestimmt (Spur auf Filterpapier).

10. Von 53 untersuchten Zigarettenfiltern von Sekretoren hatten wir 7 Fehlbestimmungen.

11. Von 14 Spuren auf Filterpapier aus dem MN-Blutgruppensystem konnten 13 Blutspuren richtig bestimmt werden.

12. Nach dem von uns benutzten Bewertungsschema über die Agglutinationsstärke überwogen die "eindeutig positiven" Befunde.

13. Die Verlängerung der Inkubationszeit mit den Anti-Seren und dem Anti-H bewirkt eine Zunahme der Agglutination der Indikator-Erythrozyten.

14. Die besten Ergebnisse konnten wir mit Anti-Seren erzielen, die einen Titer von 1 : 1024 aufwiesen und mit einem Anti-H, das einen Titer von 1 : 32 besaß.

15. Es hat sich als günstig erwiesen, für die Auswertung einer Spur 9 Präparate anzulegen.

16. Es läßt sich signifikant nachweisen, daß die meisten Fehlbestimmungen bei der Blutgruppe AB vorkommen.

17. ISHIYAMA verwendet für seine Versuche nur Frischblut. Nach unseren Erfahrungen lassen sich auch Stabilisatorblute verwenden.

18. Es lassen sich optimale Ergebnisse bei der Bestimmung von Gruppensubstanz des Menschen nach der beschriebenen Methode erzielen, wenn die Fehlerquellen, wie sie unter 2.2.5. genannt sind, berücksichtigt werden.

19. Durch die Voruntersuchungen sind wir zu dem Schluß gekommen, daß es mit großer Wahrscheinlichkeit unmöglich ist, von Non-Sekretoren die Blutgruppe aus dem Speichel zu bestimmen.

20. Die MCAR auf Klebeband ist eine Methode, die sofort in der Gerichtsmedizin eingesetzt werden kann.